



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**CARACTERIZAÇÃO DE INFECÇÃO POR *Neisseria gonorrhoeae* E
Chlamydia trachomatis EM UTENTES DE UNIDADES DE
RASTREIO DE INFECÇÃO PELO VIH E OUTRAS INFECÇÕES
SEXUALMENTE TRANSMISSÍVEIS**

MARIANA DOS SANTOS NUNES

**DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
MICROBIOLOGIA MÉDICA**

OUTUBRO 2015



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**CARACTERIZAÇÃO DE INFECÇÃO POR *Neisseria gonorrhoeae* E
Chlamydia trachomatis EM UTENTES DE UNIDADES DE
RASTREIO DE INFECÇÃO PELO VIH E OUTRAS INFECÇÕES
SEXUALMENTE TRANSMISSÍVEIS**

MARIANA DOS SANTOS NUNES

**DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
MICROBIOLOGIA MÉDICA**

ORIENTADOR: PROFESSORA DOUTORA RITA CASTRO

CO-ORIENTADOR: PROFESSORA DOUTORA FILOMENA MARTINS PEREIRA

**UNIDADE DE MICROBIOLOGIA MÉDICA DO INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL**

OUTUBRO 2015

APRESENTAÇÕES CIENTÍFICAS EFECTUADAS NO ÂMBITO DA PRESENTE DISSERTAÇÃO

Nunes M., Castro R., Mendes A., Pereira F. 2015. Infecção por *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* e *Treponema pallidum*: prevalência, fatores de risco e co-infecção em populações específicas de Lisboa. 14º Encontro Nacional de Atualização em Infeciologia, Porto, Portugal, 14-16 Outubro.

(Abstract número: 36)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Senhora Professora Doutora Rita Castro a tamanha dedicação, a confiança depositada e a incrível partilha do conhecimento, a excelência profissional contribuindo de forma brilhante para a minha construção profissional.

Agradeço à Senhora Professora Filomena Pereira pelo rigor e exigência profissional e a incrível disponibilidade, pela colaboração afetuosa e inteligente.

Agradeço à Dr.^a Ângela Mendes por toda a incansável prestabilidade, todo o auxílio prestado, competência, generosidade e profunda sensibilidade.

Agradeço à Doutora Emília Prieto pela colaboração afetuosa e apoio.

Agradeço à Dr.^a Maria Eugénia Saraiva, presidente da Liga Portuguesa Contra a Sida pela iniciativa na realização do projeto “Saúde + Perto” e a toda a equipa pelo trabalho executado, que permitiram a realização deste estudo.

Agradeço a toda a equipa que constitui o Centro de Acolhimento e Orientação à Mulher das Irmãs Oblatas (CAOMIO) pela disponibilidade demonstrada.

Agradeço a todas as pessoas envolvidas na Unidade de Microbiologia Médica do Instituto de Higiene e Medicina Tropical pela prestabilidade e paciência.

Agradeço aos meus amigos por me fazerem sentir sempre tão perto quando me sinto tão longe. Pela extrema paciência ao aguentarem a minha angústia autoral.

Agradeço aos meus pais pela confiança inabalável, por me fazerem crescer na ânsia e vontade de fazer, de procurar e nunca desistir.

Agradeço à minha irmã porque será sempre o meu farol.

Agradeço a Deus por saber que irei sempre chegar onde Ele me levar.

Para a minha avó Albertina pelo amor incondicional

“Se tiveres o hábito de fazeres as coisas com alegria, raramente encontrarás situações difíceis” Baden Powell

RESUMO

As Infecções Sexualmente Transmissíveis (IST) são um problema de saúde pública, sendo frequentemente assintomáticas. Quando diagnosticadas e tratadas atempadamente quebra-se a cadeia de transmissão e evitam-se as suas complicações.

Os objetivos do estudo foram avaliar a prevalência das infecções causadas por *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae*, co-infecções entre as mesmas e as outras IST e os factores sociodemográficos associados, em vários grupos populacionais.

A pesquisa de *C. trachomatis* e de *N. gonorrhoeae* foi realizada por uma técnica de PCR Multiplex em Tempo Real. As amostras em que a pesquisa de DNA de *C. trachomatis* foi indeterminada ou positiva foram analisadas por técnica de *Nested*-PCR e posteriormente submetidas a sequenciação. As amostras em que foi identificado DNA de *N. gonorrhoeae* foram confirmadas por técnica de RFLP. A pesquisa de anticorpos para outras IST foi executada pelas técnicas recomendadas.

A prevalência de infecção por *C. trachomatis* foi de 3,4% e idêntica entre os géneros, sendo mais frequente em mulheres com idade <25 anos. A prevalência global da infecção por *N. gonorrhoeae* foi de 1%, maioritariamente no sexo masculino. 50% apresentavam co-infecção por *C. trachomatis*. A relação entre infecção passada e atual por *N. gonorrhoeae* foi estatisticamente significativa. A percentagem de assintomáticos em ambas as infecções foi de 90% vs 83,3%, respetivamente. A maioria dos infetados referiram mais do que um parceiro sexual nos seis meses anteriores, 70% vs 83,3%, e utilização inconstante do preservativo, 80% vs 83,3%, respetivamente.

O presente estudo verificou existir uma necessidade de reforçar o rastreio de IST em determinadas populações, não só devido à sua prevalência, como pelo seu carácter maioritariamente assintomático. As associações entre os indivíduos infetados e os comportamentos de riscos, como o uso inconstante do preservativo e a multiplicidade de parceiros sexuais, estão intimamente ligadas com o maior risco de aquisição destas IST.

ABSTRACT

Sexually transmitted infections (STI) are a public health issue which are often asymptomatic. When diagnosed and treated timely, the transmission chain is broken, avoiding its complications.

The objectives of this study were to assess the prevalence of infections caused by *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*, co-infections between the two and with other STI and associated demographic factors in different population groups.

C. trachomatis and *N. gonorrhoeae*, infections was diagnosed through a multiplex Real-Time PCR. Samples in which *C. trachomatis* DNA was present or indeterminate were analysed by a Nested-PCR technique and genotyped through sequencing. Every sample in which *N. gonorrhoeae* DNA was identified were confirmed by RFLP technique. The presence of antibodies against the other STI co-infections was performed with recommended techniques.

The overall prevalence of *C. trachomatis* infection was 3,4%, and identical between genders, more often in woman <25 years old. The overall prevalence of infection with *N. gonorrhoeae* was 1% mostly in males. Which 50% had a co-infection with *C. trachomatis*. We found that *N. gonorrhoea* infection was associated with a diagnosis of gonorrhoea in the past. The proportion of asymptomatic individuals in both infections was high 90% vs 83,3%, respectively. Most of the people infected had more than one sexual partner in the previous 6 months, 70% vs 83,3%, and an inconstant condom use of 80% vs 83,3%, respectively.

This study suggests that STI systematic screening could be beneficial in certain population groups, not only because they are present, but also mostly asymptomatic. The associations found among infected individuals with high risk and behaviour such as inconsistent condom use and multiplicity of sexual partners are very worrying, significantly increases the risk of getting these STI.

ÍNDICE GERAL

APRESENTAÇÕES CIENTÍFICAS EFECTUADAS NO ÂMBITO DA PRESENTE DISSERTAÇÃO	i
AGRADECIMENTOS	ii
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
ÍNDICE GERAL.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE TABELAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 <i>Chlamydiae</i>	2
1.2 Ciclo de Desenvolvimento Celular	3
1.3 Agente Etiológico - <i>Chlamydia trachomatis</i>	4
1.3.1 Factos Históricos	5
1.3.2 Características Genómicas	5
1.3.3 Genótipos.....	5
1.3.4 Fatores de Risco do Hospedeiro	7
1.3.5 Epidemiologia	8
1.3.6 Manifestações Clínicas.....	9
1.3.7 Diagnóstico Laboratorial.....	10
1.3.7.1 Cultura	11
1.3.7.2 Testes Não-culturais	12
1.3.7.3 Testes de Amplificação de Ácidos Nucleicos - NAAT	12
1.3.8 Genotipagem	14
1.3.9 Terapêutica da Infecção por <i>C. trachomatis</i>	14
1.4 Agente Etiológico - <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	14
1.4.1 Factos Históricos	15
1.4.2 Patogenicidade.....	16
1.4.3 Fatores de Risco	17
1.4.4 Epidemiologia	17
1.4.5 Manifestações Clínicas.....	18
1.4.6 Diagnóstico Laboratorial.....	19
1.4.6.1 Microscopia	20

1.4.6.2 Cultura	20
1.4.6.3 Testes de Amplificação de Ácidos Nucleicos - NAAT	21
1.4.7 Terapêutica da Infecção por <i>N. gonorrhoeae</i>	22
1.5 Indicações para o Rastreio	23
1.6 Enquadramento e Objetivos	25
2. MATERIAL E MÉTODOS	27
2.1 Caracterização da População Estudada	27
2.2 Critérios de Exclusão	27
2.3 Recolha dos Dados Demográficos	27
2.4 Desenho do Estudo	28
2.5 Colheita e Preparação das Amostras Biológicas	29
2.6 Extração de DNA das Amostras de Urina e Exsudados	30
2.7 Pesquisa de DNA de <i>C. trachomatis</i>	30
2.7.1 Técnica de PCR – Multiplex em Tempo Real	30
2.7.2 Técnica de PCR em Tempo Real para Identificação do Serotipo L (LGV)	33
2.7.3 Genotipagem – Técnica de <i>Nested</i> -PCR	34
2.8 Pesquisa de DNA de <i>N. gonorrhoeae</i>	37
2.8.1 Técnica de PCR - Multiplex em Tempo Real	37
2.8.2 Amplificação de Uma Sequência do Gene <i>ccpB</i>	39
2.8.2.1 Digestão enzimática – RFLP	41
2.9 Pesquisa e Quantificação de Anticorpos anti- <i>T. pallidum</i>	42
2.9.1 Testes Não Treponémico – RPR	42
2.9.2 Testes Treponémico – TPHA	42
2.10 Pesquisa de anticorpos para o vírus da hepatite C	42
2.11 Pesquisa de antígenos de superfície do vírus da hepatite B (AgHBs)	43
2.12 Pesquisa de anticorpos para o vírus da imunodeficiência humana (VIH) Tipo 1/2	43
3. RESULTADOS	45
3.1 Caracterização Sociodemográfica da População em Estudo	45
3.2 Atitudes e Práticas Relativamente à Vida Sexual da População em Estudo	49
3.3 Resultados Laboratoriais	55
3.3.1 Resultados Serológicos	55
3.3.2 Pesquisa de DNA de <i>C. trachomatis</i>	56
3.3.2.1 Genotipagem	56
3.3.3 Pesquisa de DNA de <i>N. gonorrhoeae</i>	58

3.4 Pesquisa de Associações entre as Infecções por <i>C. trachomatis</i> e <i>N. gonorrhoeae</i> e as Variáveis Sociodemográficas e Clínicas.....	58
3.5 Co-infecções por <i>C. trachomatis</i> e <i>N. gonorrhoeae</i> e outras IST	67
3.6 Calculo do Risco Relativo	67
4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	69
4.1 População.....	69
4.2 Infecção por <i>C. trachomatis</i>	73
4.2.1 Genótipos.....	78
4.3 Infecção por <i>N. gonorrhoeae</i>	79
4.4 Co-infecções.....	81
4.5 Limitações do estudo	81
4.6 Conclusão e Perspectivas	82
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85
6. ANEXOS.....	98
Anexo 1: Questionário para recolha dos dados demográficos	98

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática do ciclo infeccioso de <i>Chlamydiae</i> , apresentando os diferentes estádios das duas formas morfológicas: o corpúsculo reticulado (CR) e o corpúsculo elementar (CE)	4
Figura 2 - Resultado da amplificação correspondente ao sinal de fluorescência no canal JOE, através da técnica de PCR – Multiplex em Tempo Real de diversas amostras clínicas.	33
Figura 3 - Distribuição da população por grupos etários, em frequência relativa.....	46
Figura 4 - Distribuição da população em relação à orientação sexual, em frequência relativa	48
Figura 5 - Distribuição global das respostas obtidas em relação à utilização do preservativo nas relações sexuais vaginais, na escala: <i>sempre, sempre exceto com o parceiro, ocasionalmente, nunca</i>	52
Figura 6 - Distribuição global das respostas obtidas em relação à utilização do preservativo nas relações sexuais orais, na escala: <i>sempre, sempre exceto com o parceiro, ocasionalmente, nunca</i>	52
Figura 7 - Distribuição global das respostas obtidas em relação à utilização do preservativo nas relações sexuais anais, na escala: <i>sempre, sempre exceto com o parceiro, ocasionalmente, nunca</i>	52
Figura 8 - Resultado da amplificação pela técnica de <i>Nested-PCR</i> , após eletroforese em gel de agarose a 1,5%, em tampão TAE 0,5X, com brometo de etídio (0,5µg/ml).....	57
Figura 9 - Distribuição dos genótipos de <i>C. trachomatis</i> , em frequência relativa	57
Figura 10 - Relação entre a infecção por <i>C. trachomatis</i> e a idade.....	61

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Incidência de IST curáveis em adultos estimada pela OMS e pelo ECDC	2
Tabela 2 - Características associadas aos diferentes genótipos de <i>C. trachomatis</i>	7
Tabela 3 - <i>Primers</i> e sondas utilizados na técnica de MTR-PCR para detecção de DNA de <i>C. trachomatis</i>	31
Tabela 4 - Condições da técnica de MTR-PCR para a detecção de DNA de <i>C. trachomatis</i>	32
Tabela 5 - Condições da técnica de RT-PCR para a detecção do serotipo L de <i>C. trachomatis</i> em amostras positivas pela técnica de MTR-PCR.....	34
Tabela 6 - <i>Primers</i> utilizados na técnica de <i>Nested</i> -PCR para detecção de um fragmento do gene <i>omp1</i> de <i>C. trachomatis</i>	35
Tabela 7 - Condições de <i>Outer</i> -PCR	35
Tabela 8 - Condições de <i>Inner</i> -PCR	36
Tabela 9 - <i>Primers</i> e sondas utilizados na técnica de MTR-PCR para a detecção de DNA de <i>N. gonorrhoeae</i>	38
Tabela 10 - Condições da técnica de MTR-PCR para a detecção de DNA de <i>N. gonorrhoeae</i>	38
Tabela 11 - <i>Primers</i> utilizados na técnica de PCR para detecção do gene <i>ccpB</i> de <i>N. gonorrhoeae</i>	39
Tabela 12 - Condições de PCR para a amplificação de uma sequência do gene <i>ccpB</i> de <i>N. gonorrhoeae</i>	40
Tabela 13 - Condições de digestão do produto de PCR com a enzima de restrição <i>MspI</i>	41
Tabela 14 - Caracterização da população de acordo com o gênero.....	45
Tabela 15 - Estatística descritiva da variável idade segundo o gênero e comparação das medianas através do teste de Mann-Whitney-Wilcoxon	46
Tabela 16 – Distribuição da população de acordo com os níveis de escolaridade	47

Tabela 17 – Estatística descritiva da número de parceiros(as) nos últimos seis meses segundo a situação profissional e comparação das medianas através do teste de Kruskal-Wallis	50
Tabela 18 – Distribuição da população de acordo com o tipo de contacto sexual praticado	51
Tabela 19 - Utilização do preservativo em cada tipo de contacto sexual praticado em relação ao género	53
Tabela 20 - Resultados serológicos de acordo com o género	55
Tabela 21 - Resultados da pesquisa de DNA de <i>C. trachomatis</i>	56
Tabela 22 - Frequência da infeção por <i>C. trachomatis</i> por género através de um intervalo de confiança a 95% obtido pelo método de Wilson	58
Tabela 23 - Genótipos de <i>C. trachomatis</i> identificados por género	59
Tabela 24 - Frequência da infeção por <i>N. gonorrhoeae</i> por género através de um intervalo de confiança de 95% obtido pelo método de Wilson	60
Tabela 25 – Relação entre as características demográficas da população e a infeção por <i>C. trachomatis</i> e por <i>N. gonorrhoeae</i>	63
Tabela 26 - Relação entre a orientação sexual e a infeção por <i>C. trachomatis</i> e por <i>N. gonorrhoeae</i>	64
Tabela 27 - Relação entre o número de parceiros(as) nos últimos seis meses e a infeção por <i>C. trachomatis</i> e por <i>N. gonorrhoeae</i>	65
Tabela 28 - Relação entre o uso do preservativo e a infeção por <i>C. trachomatis</i> e por <i>N. gonorrhoeae</i>	66
Tabela 29 - Análises entre a relação de algumas variáveis sociodemográficas seleccionadas e a infeção por <i>C. trachomatis</i> e <i>N. gonorrhoeae</i> (intervalo de confiança a 95%)	68

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentagem
°C	Grau <i>Celsius</i>
µg	Micrograma
µl	Microlitro
µM	Micromolar
A	<u>A</u> mpere
Ac	<u>A</u> nticorpo
AgHBs	<u>A</u> ntigénio de superfície do vírus da <u>h</u> epatite <u>B</u>
ATCC	<u>A</u> merican <u>T</u> ype <u>C</u> ulture <u>C</u> ollection
AMR	Resistência Antimicrobiana, do inglês <i>Antimicrobial Resistance</i>
ATP	Adenosina-5'-trifosfato, do inglês <i>adenosine-5'-triphosphate</i>
CAOMIO	<u>C</u> entro de <u>A</u> colhimento e <u>O</u> rientação à <u>M</u> ulher das <u>I</u> rmãs <u>O</u> blatas
CD	Domínio constante, do inglês <i>constant domains</i>
CDC	Centro para Prevenção e Controlo de Doenças, do inglês <i>Center for Disease Control and Prevention</i>
CE	<u>C</u> orpúsculo <u>E</u> lementar
CI	<u>C</u> ontrolo <u>I</u> nterno
CIM	<u>C</u> oncentração <u>I</u> nibitória <u>M</u> ínima
CR	<u>C</u> orpúsculo <u>R</u> eticular
DDO	<u>D</u> oença de <u>D</u> eclaração <u>O</u> brigatória
DFA	Teste de Imunofluorescência Direta, do inglês <i>Direct immunofluorescence assay</i>
DGS	<u>D</u> ireção <u>G</u> eral de <u>S</u> aúde
DIP	<u>D</u> oença <u>I</u> nflamatória <u>P</u> élvica
DNA	Ácido Desoxirribonucleico, do inglês <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatado, do inglês <i>Nucleoside Triphosphate</i>
DST	<u>D</u> oença <u>S</u> exualmente <u>T</u> ransmissível
ECDC	Centro Europeu de Prevenção e Controlo das Doenças, do inglês <i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>
EEE	<u>E</u> spaço <u>E</u> conómico <u>E</u> uropeu
EUA	<u>E</u> stados <u>U</u> nidos da <u>A</u> mérica
Euro-GASP	Programa europeu de vigilância gonocócica antimicrobiana, do inglês <i>The European Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme</i>
FDA	Entidade norte-americana reguladora alimentar e do medicamento, do inglês <i>Food and Drug Administration</i>
HPV	Vírus do papiloma humano, do inglês <i>human papilloma virus</i>
HSH	<u>H</u> omens que fazem <u>s</u> exo com <u>h</u> omens
IC	<u>I</u> ntervalo de <u>C</u> onfiança
IST	<u>I</u> nfeção <u>S</u> exualmente <u>T</u> ransmissível
LGV	Linfogranuloma Venéreo do inglês <i>Lymphogranuloma Venereum</i>

LPCS	<u>L</u> iga <u>P</u> ortuguesa <u>C</u> ontra a <u>S</u> ida
LPS	<u>L</u> ipopolissacarídeo
M	Molar
ml	Mililitro
MLST	<u>M</u> ultilocus <u>S</u> equen <u>T</u> yping
MOMP	Proteína principal da membrana externa, do inglês <u>M</u> ajor <u>O</u> uter <u>M</u> embrane <u>P</u> rotein
MRT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase Multiplex em Tempo Real, do inglês <u>M</u> ultiplex <u>r</u> eal- <u>t</u> ime <u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction
NAAT	Técnicas de Amplificação de Ácidos Nucleicos, do inglês <u>N</u> ucleic <u>A</u> cid <u>A</u> mplification <u>T</u> echniques
nvCT	Nova variante Sueca de <i>C. trachomatis</i> do inglês, <u>S</u> wedish <u>n</u> ew <u>v</u> ariant <u>C</u> . <u>t</u> rachom <u>a</u> tis
OMS	<u>O</u> rganização <u>M</u> undial de <u>S</u> aúde
PALOP	<u>P</u> aíses <u>A</u> fricanos de <u>L</u> íngua <u>O</u> ficial <u>P</u> ortuguesa
pb	<u>P</u> ares de <u>b</u> ases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês <u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction
pCT	<u>P</u> lasmídeo <u>c</u> ríptico de <i>C. trachomatis</i>
pH	Simétrico do logaritmo decimal da concentração hidrogeniônica de uma solução
PMN	<u>P</u> olimorfonucleados
RFLP	<u>R</u> estriction <u>F</u> ragment <u>L</u> ength <u>P</u> olymorphism
RNA	Ácido Ribonucleico, do inglês <u>R</u> ibonucleic <u>A</u> cid
rpm	Rotações por minuto
RPR	<u>R</u> apid <u>P</u> lasm <u>R</u> egin
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real, do inglês <u>r</u> eal- <u>t</u> ime <u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction
spp	Abreviatura de Espécies, do inglês <i>species</i>
TAE	Tampão <u>T</u> ris- <u>A</u> cetato- <u>E</u> DTA
TE	<u>T</u> ampão de <u>E</u> lução Tris-HCl
TPHA	<u>T</u> reponema <u>p</u> allidum <u>H</u> emagglutination <u>A</u> ssay
TSA	<u>T</u> estes de <u>S</u> uscetibilidade <u>A</u> ntimicrobiana
TSSy	Sistema de Vigilância Europeu, do inglês <u>E</u> uropean <u>S</u> urveillan <u>c</u> e <u>S</u> ystem
UE	<u>U</u> nião <u>E</u> uropeia
UMR	<u>U</u> nidade <u>M</u> óvel de <u>R</u> astreios
UNAIDS	Programa conjunto das Nações Unidas sobre HIV e SIDA, do inglês <u>U</u> nited <u>N</u> ations <u>P</u> rogramme on <u>H</u> IV and <u>A</u> IDS
VHC	<u>V</u> írus da <u>h</u> epatite <u>C</u>
VIH	<u>V</u> írus da <u>i</u> munodeficiência <u>h</u> umana
V	<u>V</u> olt
VD	Domínio variável, do inglês <u>v</u> ariable <u>d</u> omains
VPP	<u>V</u> alor <u>P</u> reditivo <u>P</u> ositivo

1. INTRODUÇÃO

As Infecções Sexualmente Transmissíveis (IST) são um crescente problema de saúde pública, social e económico a nível mundial, atingindo essencialmente mulheres adolescentes e jovens adultos (1–3). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), mais de 1 milhão de pessoas adquire uma IST todos os dias e meio bilião de novos casos de IST curáveis ocorrem no mundo todos os anos (4). Um diagnóstico precoce, bem como uma terapêutica atempada e correta, são tão importantes na interrupção da cadeia de transmissão, como na prevenção das complicações e sequelas graves nos indivíduos infetados (1).

As IST encontram-se entre as doenças infecciosas mais comuns e com maior taxa de morbilidade, tendo um profundo impacto sobre a saúde sexual e reprodutiva em todo o mundo (1,4). A morbilidade e a mortalidade originada por estas infeções são agravadas, devido à facilidade de transmissão e aquisição sexual do vírus da imunodeficiência humana (VIH), o qual continua a disseminar-se por todo o mundo com predomínio nos países de baixa renda (1).

Este grupo de infeções é pouco divulgado pela comunicação social durante as campanhas de saúde e controlo de infeção pelo VIH, apesar de se conhecer que aumentam a probabilidade de aquisição e transmissão do mesmo em três vezes ou mais, podendo as IST serem, segundo a OMS, responsáveis por 40% das transmissões mundiais daquele vírus (1,4). O aumento da suscetibilidade ao VIH está relacionado com o facto das IST danificarem as mucosas, com consequente aumento da presença de macrófagos suscetíveis ao vírus (5).

A OMS juntamente com o Programa Conjunto das Nações Unidas sobre VIH e SIDA (UNAIDS, do inglês *United Nations Programme on HIV and AIDS*) consideram o controlo das IST uma intervenção prioritária para a prevenção da infeção pelo VIH (1).

O número total de agentes patogénicos, como bactérias, vírus, fungos e parasitas que podem ser sexualmente transmitidos excede os trinta, os quais podem originar manifestações clínicas diversas, tendo como fator comum o modo de transmissão: relações sexuais entre os seres humanos (1,4,6). Oito destes microrganismos patogénicos são considerados os mais importantes agentes de IST uma vez que, causam

maioritariamente infeções genitais (Tabela 1). Destes *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Treponema pallidum* e *Trichomonas vaginalis* originam infeções passíveis de ser tratadas e curadas, e por isso são conhecidas como grupo das “IST com cura”, enquanto que os vírus da hepatite B, do herpes simplex, do VIH e do papiloma humano (HPV, do inglês *human papilloma virus*) causam infeções virais incuráveis, mas cuja sintomatologia e complicações podem ser minimizadas através de tratamento correto e específico (4,7).

Tabela 1 - Incidência de IST curáveis em adultos estimada pela OMS e pelo ECDC

	Nº de Casos/ano		
	Mundo ¹ 2008	UE ² 2012	Portugal ² 2012
Gonorreia (<i>Neisseria gonorrhoeae</i>)	106,1 milhões	49 869	119
Clamidiose (<i>Chlamydia trachomatis</i>)	105,7 milhões	360 698	- ^{a)}
Sífilis (<i>Treponema pallidum</i>)	10,6 milhões	20 654	264
Tricomoniase (<i>Trichomonas vaginalis</i>)	276,4 milhões	- ^{a)}	- ^{a)}

Legenda: UE – União Europeia

^{a)} Não notificado

Resultados publicados por: ¹OMS (2012) (8) ²ECDC (2015) (2)

As IST são transmitidas predominantemente através do contacto sexual, do tipo vaginal, oral e anal (7). Contudo a transmissão também pode ocorrer verticalmente de mãe para filho durante a gravidez e/ou parto, assim como através do sangue infetado ou ainda por autoinoculação (4,7).

C. trachomatis e *N. gonorrhoeae* são as IST bacterianas mais prevalentes em todo o mundo, verificando-se este mesmo padrão na Europa (2,8).

Na atualidade é notório o esforço efetuado na implementação de medidas de intervenção simples, quer na prevenção quer no diagnóstico de algumas IST, sobretudo em subpopulações específicas nos países de alta renda (2,4,9).

1.1 *Chlamydiae*

Chlamydiae é a designação dada a bactérias que coram negativamente pela técnica de Gram, que são intracelulares obrigatórias e detentoras da capacidade de infetar células eucarióticas (10–12). Filogeneticamente são distintas das outras bactérias por possuírem um ciclo de crescimento único que envolve uma alternância entre duas

formas morfológicas especializadas, o corpúsculo reticulado (CR) e o corpúsculo elementar (CE), permitindo uma adaptação alternada de parasitismo intracelular e permanência extracelular (10,12). O CE é a forma infecciosa, que apesar de ter uma estrutura estável, que lhe permite propagar-se no ambiente extracelular, é metabolicamente inativo, e o CR é a forma não infecciosa, contudo metabolicamente ativa dispondo da capacidade de replicar dentro da célula hospedeira (11,13,14). Estas duas formas morfológicas possuem um sistema de secreção do tipo III (T3SS) que lhes permite libertar para o exterior da célula hospedeira proteínas, promovendo a entrada de novas bactérias na célula hospedeira (11,15,16).

Devido a estas propriedades únicas, as bactérias *Chlamydiae* foram classificadas na sua própria ordem e família (*Chlamydiales*, *Chlamydiaceae*) (14,17).

Estas bactérias apresentam uma competência metabólica limitada, devido à ausência da capacidade de sintetizar adenosina-5'-trifosfato (ATP, do inglês *Adenosine-5'-Triphosphate*), aminoácidos, vitaminas e cofatores. Por isso, restringem-se a um estilo de vida intracelular, tornando-se dependentes da célula hospedeira para o fornecimento de energia e de nutrientes (12,18).

Chlamydiae possui na sua membrana externa lipopolissacarídeo (LPS) e a proteína principal da membrana externa (MOMP, do inglês *Major Outer Membrane Protein*) codificada pelo gene *omp1* (*ompA*), para além de outras proteínas necessárias à sua estrutura (19,20). A proteína MOMP possui epítomos espécie-específicos, que contêm quatro regiões de sequências variáveis de aminoácidos, VD1-VD4 (do inglês, *variable domains*), responsáveis pela variabilidade antigénica e especificidade das espécies (12).

1.2 Ciclo de Desenvolvimento Celular

Como referido anteriormente *Chlamydiae* são bactérias intracelulares obrigatórias que infetam as células do hospedeiro originando um vacúolo especializado, neste desenvolvem-se e multiplicam-se através de um ciclo de desenvolvimento bifásico com a duração de 72-80h (Figura 1) (10,12,14,18).

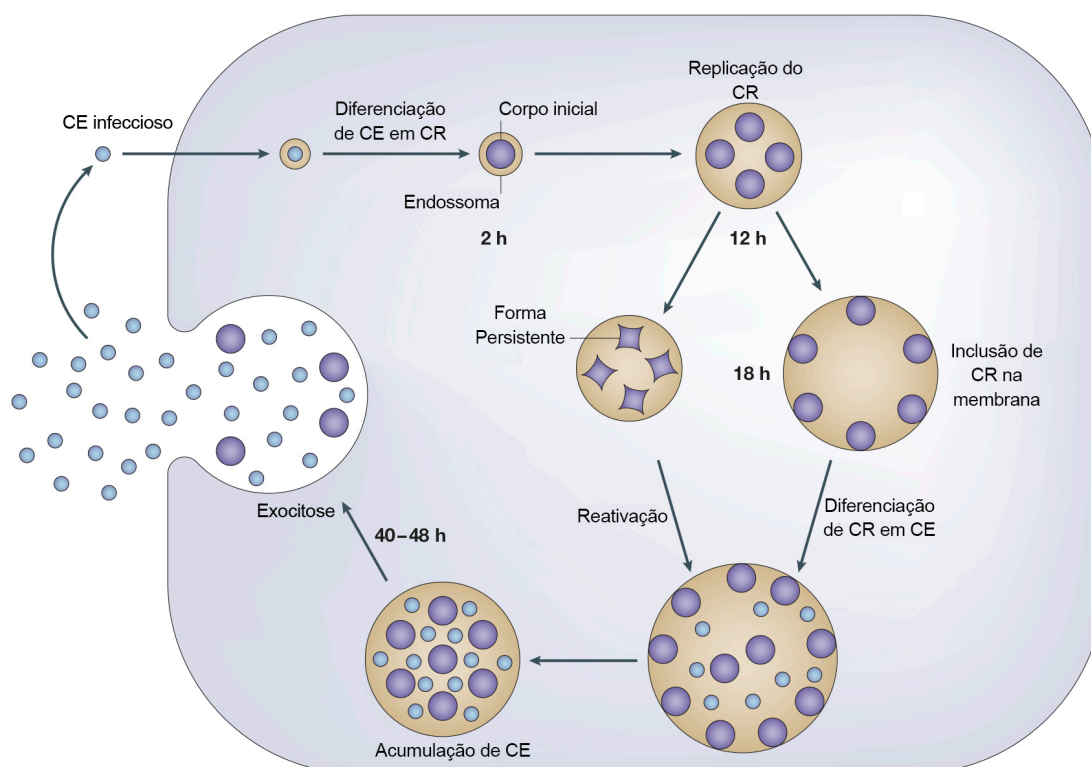


Figura 1 - Representação esquemática do ciclo infeccioso de *Chlamydiae*, apresentando os diferentes estádios das duas formas morfológicas: o corpúsculo reticulado (CR) e o corpúsculo elementar (CE)

Adaptado de: Brunham, R. *et al.* (2005) (21)

O CE liga-se à membrana citoplasmática da célula da mucosa proporcionada pela interação ligando-receptor, penetrando na célula hospedeira por endocitose, infectando-a. Posteriormente, este é rodeado pela membrana endoplasmática criando um endossoma, rico em glicogénio, formando-se assim um nicho intracelular favorável à replicação do agente infeccioso. O CE transforma-se em CR replicando-se por divisão binária (11,13,20). Quando os nutrientes da célula hospedeira se esgotam os CR transformam-se gradualmente em CE, os quais por ruptura do endossoma são libertados para o meio extracelular, infectando novas células (12,21).

1.3 Agente Etiológico - *Chlamydia trachomatis*

C. trachomatis é um agente patogénico intracelular obrigatório estritamente humano, com tropismo para o epitélio colunar sobretudo das zonas das mucosas genitais como a do endocérnix, da uretra e do reto, bem como das mucosas não-genitais, tais como a da orofaringe e a ocular (10,21). A infeção provocada por *C. trachomatis* é

responsável por tracoma, conjuntivite de inclusão, infecções urogenitais e respiratórias (12,19).

A espécie *C. trachomatis* pertence à família *Chlamydiaceae*, à ordem *Chlamydiales* e ao género *Chlamydia* (14,17).

1.3.1 Factos Históricos

Doenças humanas causadas por *C. trachomatis* são referidas desde a antiguidade (10,18). Em 1907 Halberstaedter e Von Prowazek visualizaram corpos de inclusão, numa amostra de um exsudado ocular proveniente de um indivíduo com tracoma, caracterizando-os como o agente do tracoma. Três anos depois, em 1910 surge a primeira descrição de infeção no aparelho urogenital, quando Heyman observou os mesmos corpos de inclusão no exsudado uretral de um doente (10).

1.3.2 Características Genómicas

O cromossoma de *C. trachomatis* é formado por cerca de 1 042 50 pb (15,18). A maioria das espécies possui também 5 a 10 cópias de um plasmídeo críptico (pCT) com cerca de 7 500 pb, o qual apresenta importância na prática laboratorial, sendo usado como alvo em técnicas de deteção de ácidos nucleicos para o diagnóstico da infeção causada por *C. trachomatis*, uma vez que este está sobre pressão seletiva positiva (18,22). Contudo, no final de 2006 foi relatada, na Suécia, uma nova variante de *C. trachomatis* (nvCT do inglês *Swedish new variant of C. trachomatis*) que continha uma deleção de 377 pb no genoma do pCT, pondo em causa a viabilidade deste alvo nas técnicas de diagnóstico (18,23,24).

1.3.3 Genótipos

A sequência do ácido desoxirribonucleico (DNA do inglês *Deoxyribonucleic Acid*) da proteína da membrana MOMP é constituída por quatro domínios variáveis (VD1-VD4) intercalados por domínios constantes (CD, do inglês *constant domains*), sendo que a variação dos VD é responsável pelos diferentes génotipos, devido à substituição de nucleótidos aí presentes, que resulta numa diferença de aminoácidos (16,25,26). Até ao momento são conhecidos 20 génotipos distintos, definidos com base no tropismo tecidual e no tipo de infeção que originam (Tabela 2) (12,15,18,27).

Os genótipos A, B, Ba e C infetam as células da mucosa da conjuntiva originando o tracoma, uma doença ocular responsável por cegueira em zonas endêmicas como África, Médio Oriente, Ásia e América do Sul (10,16,18).

Os genótipos D, Da, E, F, G, Ga, H, I, Ia, J e K são transmitidos sobretudo por contacto sexual, sendo responsáveis por as IST infetando as células do epitélio colunar rectal e genital causando uretrite no sexo masculino e cervicite (e uretrite) no sexo feminino (14,21,28). Estes genótipos podem também ser isolados a partir de exsudados provenientes de infeções oculares de recém-nascidos, adquiridas durante a passagem através de um canal de parto infetado (26,28). Em relação a estes, os genótipos E seguido do F, originam cerca de 40% das infeções do trato urogenital em populações heterossexuais (12,15,27). Os genótipos G, D e J são mais frequentemente isolados de infeções rectais que ocorrem na subpopulação de homens que fazem sexo com homens (HSH) (29–31). O sucesso ecológico associado aos genótipos E e F, é atualmente desconhecido, mas análises genómicas sugerem a existência de adesinas específicas ou fatores de virulência ainda não reconhecidos, que à partida podem conferir a estas estirpes alguma vantagem funcional e/ou estrutural aquando da infeção e/ou transmissão (32,33).

Os genótipos L1, L2, L2a, L2b e L3 estão também associados à transmissão sexual, sendo responsáveis pelo Linfogranuloma Venéreo (LGV, do inglês *Lymphogranuloma Venereum*) (28). Estes ao invés dos acima descritos são mais invasivos, proliferando em monócitos do tecido linfático originando infeção sistémica (14,34). O LGV é endémico nos países de baixa renda (28,30,35). Contudo desde 2003, surtos de LGV foram documentadas entre HSH na Europa e na América do Norte (35–37).

Tabela 2 - Características associadas aos diferentes genótipos de *C. trachomatis*

Genótipos	Características	Tropismo celular	Infeção
A-C (Incl. Ba)	Não Invasivo	Células Epiteliais	Tracoma Endêmico
D-K (Incl. Da, Ga, Ia)	Não Invasivo	Células Epiteliais	Urogenital Conjuntivite Pneumonia infantil
L1, L2, L3 (Incl. L2a, L2b)	Invasivo	Células Linfáticas	LGV

Legenda: Incl.- Incluindo, LGV - linfogranuloma venéreo

Adaptado de: “Laboratory diagnosis of sexually transmitted infections, including human immunodeficiency virus”, WHO (2013) (34)

Existe uma grande variabilidade nos genótipos de *C. trachomatis* isolados de IST (18,38). Todavia, estes exibem um grau extremamente elevado de similaridade genômica (>98%), considerando a sua singularidade biológica em termos de tropismo tecidual, *in vivo* (14).

Com recurso ao método de tipagem molecular MLST (do inglês, *Multilocus Sequence Typing*), alguns estudos realizados não encontram nenhuma relação para o tropismo tecidual, como tal, os autores consideraram as diferentes distribuições dos genótipos de *C. trachomatis* será devido a redes sexuais separadas (29,39).

1.3.4 Fatores de Risco do Hospedeiro

O fator demográfico mais comum à infeção por *C. trachomatis* é a idade, verificando-se, uma relação estreita entre o aparecimento de infeção e a idade, com maiores taxas de infeção a ocorrer em indivíduos do sexo feminino, jovens, sexualmente ativas com idade igual ou inferior a 25 anos (2,20,26,40).

Outros fatores podem aumentar o risco da aquisição da infeção, como o número de parceiros sexuais, o uso inconstante do preservativo e IST coexistente (20,40). A etnia negra e o estado civil podem ser interpretados como fatores de risco, o que parece estar relacionado, em grande parte, por determinantes sociais como o número de parceiros sexuais (26,41). Por outro lado fatores ambientais, sociais e culturais tais como o conhecimento insuficiente sobre a saúde sexual, a falta de cuidados de saúde

primários, e o menor nível socioeconómico podem influenciar a aquisição da infeção, embora não se saiba ainda exatamente como (42).

O comportamento sexual de risco é um fator de risco importante na reinfeção, tendo sido documentadas taxas de 10-30% de reinfeções em adolescentes jovens com múltiplos parceiros sexuais (43).

Em relação ao género, a maioria das infeções ocorrem no sexo feminino, o que pode estar associado a fatores anatómicos que o tornam mais vulnerável a esta IST, como a presença do epitélio colunar no colo do útero, alterações na flora vaginal e a produção de muco (20,27). O uso de contraceptivos orais, também pode provocar alterações anatómicas, nomeadamente na superfície do endométrio, tornando-o mais suscetível à infeção (6,20).

Recentemente demonstrou-se que o HPV partilha a via de transmissão e os mesmos fatores de risco que a infeção por *C. trachomatis*, embora esta evidência ainda não seja consistente (44,45).

1.3.5 Epidemiologia

Segundo a OMS e o Centro Europeu de Prevenção e Controlo das Doenças (ECDC do inglês *European Centre for Disease Prevention and Control*) a infeção genital por *C. trachomatis* é a IST bacteriana mais comum no mundo em geral e na Europa em particular (2,34,43,46).

A OMS estimou para 2008 uma incidência mundial de infeção por *C. trachomatis* de 105,7 milhões de casos, com a maioria dos casos no Pacífico Ocidental, sendo que 20,6 milhões de casos foram registados na Europa (8).

No ano de 2013, o ECDC registou uma taxa de incidência de 182 casos de infeção por *C. trachomatis* por 100 000 habitantes em 26 países europeus (UE, União Europeia) pertencentes ao Espaço Económico Europeu (EEE), 83% dos quais, somente em quatro países (Dinamarca, Noruega, Suécia e Reino Unido) (46). A maioria dos casos ocorreram em idades mais jovens, sendo que dois terços entre os 15 e 24 anos de idade, com a maior taxa referida em indivíduos do sexo feminino com 20 a 24 anos (46).

Um aumento do número dos casos registados na Europa é visível, existindo uma associação entre a taxa de notificação da infeção e o nível das atividades de controlo

desta (43,46). Todavia, a comparação entre países é dificultada pelas diferenças, nos sistemas de vigilância, nos métodos de diagnóstico utilizados, e na proporção de subnotificação devido às infeções assintomáticas (2,46). A incidência assume taxas distintas dependendo da população estudada, observando-se percentagens de infeção mais elevadas na população mais jovem, de notar que a maioria dos estudos se realiza na faixa etária considerada como a mais suscetível à infeção (47,48).

Na Europa observa-se um aumento da transmissão no grupo HSH, apesar da escassez dos dados (2).

Em Portugal os dados sobre a incidência da infeção por *C. trachomatis* são escassos, uma vez que só em 2014 esta infeção passou a ser uma doença de declaração obrigatória (DDO) (49). Os estudos portugueses que a caracterizam têm encontrado prevalências variáveis (1,6%-8,4%) (50–54). O pode estar relacionado com a heterogeneidade da população estudada (50).

No que diz respeito ao LGV, os casos existentes nos países de alta renda estão confinados à população de HSH, com comportamentos sexuais de alto risco, sendo que a maioria dos infetados apresenta infeção concomitante com o VIH e o vírus da hepatite C (VHC) (2,55).

A infeção por *C. trachomatis* tem um grande impacto na saúde pública não só pela recorrência da infeção ser comum, como devido à morbilidade que pode originar, sobretudo a nível do sistema reprodutor feminino (20,26,27).

O grande desafio no diagnóstico desta infeção prende-se sobretudo com a grande percentagem de indivíduos assintomáticos, correspondendo, a pelo menos 30-50% no sexo masculino e 70-90% no sexo feminino dos casos de infeção, o que permite uma disseminação incontável da mesma (12,20,34).

1.3.6 Manifestações Clínicas

C. trachomatis é transmitida através de secreções e do contacto com células epiteliais colunares infetadas da uretra, endocérnix, reto, conjuntiva e orofaringe quando de relação sexual do tipo vaginal, oral ou retal (14,21,34). A maioria das infeções pelas quais esta bactéria é responsável são infeções do trato urogenital inferior do sexo masculino e do trato genital do sexo feminino, associadas aos genótipos D-K (28,34). Além de que, pode provocar infeções perinatais como conjuntivite (30-50%) e

pneumonia, ou conjuntivite de inclusão por secreções genitais de indivíduos infectados autoinoculadas na conjuntiva (26,28,34).

No sexo masculino a infecção por *C. trachomatis* é considerada a maior causa de uretrite não-gonocócica, que quando não tratada pode originar epidemite aguda e síndrome de Reiter (12). Quando sintomática a uretrite provoca disúria e um corrimento uretral escasso, claro e esbranquiçado (28).

No sexo feminino a infecção genital tem a sua localização primária no colo do útero, contudo esta também pode ocorrer na uretra e no reto (26,41). Quando sintomática manifesta-se por um corrimento vaginal mucopurulento e/ou hemorragia pós-coito (26,28). Pode originar salpingite, cervicite, uretrite, endometrite, que quando não detetadas e tratadas possibilitam complicações com consequências graves, como a doença inflamatória pélvica (DIP), que pode levar a uma gravidez ectópica, infertilidade tubária e dor abdominal crónica (12,26).

Estudos efetuados na Europa parecem demonstrar que a infecção causada por *C. trachomatis* é responsável por pelo menos, 40-60% dos casos de DIP, assim como de dois terços dos casos de infertilidade tubária e de um terço dos casos de gravidez ectópica (26,43)

O LGV é caracterizado por adenopatia inguinal com ou sem uma lesão primária associada (36). Quando há evidência de lesão esta é mais comumente descrita no sexo masculino (34).

1.3.7 Diagnóstico Laboratorial

Os avanços nas técnicas de diagnóstico laboratorial e nos métodos de colheita das amostras vieram facilitar a deteção, tratamento e prevenção desta infecção (26,34).

O diagnóstico laboratorial correto da infecção por *C. trachomatis* está diretamente relacionado com uma correta execução da colheita da amostra biológica a analisar (20,56). Os locais anatómicos para essa colheita e posterior identificação do microrganismo variam consoante os sintomas e o teste de diagnóstico laboratorial a ser aplicado (26,34).

Para a pesquisa de *C. trachomatis* podem ser utilizados métodos culturais e não culturais (34,56).

Para a cultura, é necessário manter a viabilidade do microrganismo, pelo que a sensibilidade desta, dependente de uma colheita correta e adequada (26,28,34,57). Deve, portanto ser efetuada de modo a obter células epiteliais colunares, do canal endocervical e/ou da uretra no sexo feminino, ou da uretra no caso do sexo masculino (20,28,34).

Nos métodos não culturais, que utilizam técnicas de biologia molecular, a manutenção da viabilidade do microrganismo não é tão necessária, contudo a colheita deve ser efetuada de forma a garantir carga bacteriana suficiente à sua deteção (26). A grande vantagem que este tipo de testes oferece, é o facto de não necessitarem de técnicas invasivas para a colheita da amostra (20,28,57). No caso do sexo masculino, a amostra a colher é a urina, uma vez que a infeção se localiza na uretra onde o número de microrganismos está suficientemente concentrado para ser detetado com estes ensaios. No sexo feminino, como a infeção se localiza sobretudo no canal endocervical, a amostra ideal não invasiva é a secreção vaginal (20,26,34,56). Com este tipo de amostras, a colheita pode ser autónoma (57). Por outro lado estes ensaios são também mais sensíveis para a identificação de infeções extragenitais, como as rectais e as da orofaringe embora não estejam aprovados pela FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*) (34,40,41,56,58).

1.3.7.1 Cultura

O método de diagnóstico baseado na cultura é considerado a técnica padrão, já que apresenta uma especificidade de 100%, no entanto é difícil de padronizar, tecnicamente exigente, demorado, caro, com requisitos de colheita de amostra e de transporte exigentes e relativamente insensível (70-85%) (20,26).

Para a realização da cultura as amostras devem ser colhidas com uma zaragatoa específica (Dacron[®]), devido à existência de materiais que podem inibir o crescimento da bactéria (20,59). Para a colheita, a zaragatoa deve ser inserida 2-3 cm na uretra masculina ou 1-2 cm no canal endocervical, e em qualquer dos casos efetuar-se duas a três rotações (34,59). A amostra deve ser armazenada e refrigerada em meio de transporte apropriado (28,59).

Como já referido *C. trachomatis* é um microrganismo intracelular obrigatório e como tal necessita de linhas celulares que suportem o seu crescimento, sendo as McCoy, BGMK ou HeLa 229 as mais utilizadas (20,59).

As células inoculadas são colhidas após 48-72 horas de crescimento, para verificar a presença da infeção a partir da observação por imunofluorescência de inclusões intracitoplasmáticas características que contêm um número substancial de CE e de CR (20).

Atualmente a cultura não é recomendada como método de diagnóstico de rotina, devendo apenas ser usada para fins de investigação: testes de suscetibilidade antimicrobiana (TSA), estudos genético e epidemiológicos (34,59).

1.3.7.2 Testes Não-culturais

Os testes não culturais, de pesquisa de *C. trachomatis*, como os de deteção de antígenos por microscopia de fluorescência ou por ensaios imunoenzimáticos, e a hibridação de ácidos nucleicos, devido à sua pouca especificidade têm sido substituídos pelos testes de amplificação de ácidos nucleicos (NAAT, do inglês *Nucleic Acid Amplification Techniques*), não sendo atualmente recomendados (26,34,59).

Todavia o teste de imunofluorescência direta (DFA, do inglês *direct immunofluorescence assay*) é ainda o único teste aprovado pela FDA para o diagnóstico laboratorial de infeções oculares causadas por *C. trachomatis* (59). Neste é utilizado um anticorpo monoclonal marcado com fluoresceína que se liga especificamente ao antígeno e permite a observação dos CE (20,26).

A pesquisa de anticorpos anti-*C. trachomatis* devido à sua baixa sensibilidade e especificidade, é apenas utilizada em estudos epidemiológicos e no auxílio ao diagnóstico de doença sistémica, como é o caso de infeções neonatais e LGV, embora a interpretação dos resultados seja, por vezes, difícil (34).

1.3.7.3 Testes de Amplificação de Ácidos Nucleicos - NAAT

Os NAAT apresentam características de desempenho superiores, como uma maior sensibilidade e especificidade, em comparação com quaisquer outros tipos de testes para o diagnóstico laboratorial desta infeção (20,26,28,40). Estes testes foram concebidos para amplificar e detetar sequências de ácidos nucleicos específicas de *C.*

trachomatis sendo ainda detentores de uma capacidade de produção de um sinal positivo a partir de uma única cópia do DNA/RNA alvo (do inglês *Ribonucleic Acid*) (20,57). A sua principal desvantagem é o facto de requererem equipamento caro e potencialmente inacessível para países de baixa renda (20,41).

Os vários tipos de NAAT existentes diferem nos seus métodos de amplificação e nas sequências alvo de ácidos nucleicos (28,59). De um modo geral, apresentam elevada sensibilidade, não sendo necessária a confirmação de amostras positivas por outro teste se o primeiro for suficientemente discriminatório (20,34,56). Este é o caso dos testes que utilizam a técnica de PCR Multiplex em Tempo Real (MTR-PCR, do inglês *Multiplex Real-Time Polymerase Chain Reaction*), que deteta em simultâneo DNA do pCT e do gene *ompI* que codifica para a MOMP de *C. trachomatis*, apresentando maior sensibilidade e especificidade em relação a outros NAAT (22,28). A utilização dos dois alvos deve-se a que, apesar de existirem inúmeras cópias do pCT no genoma de *C. trachomatis* (razão pela qual a maioria dos NAAT o usa como alvo de amplificação), foram descritos casos de deteção de DNA de *C. trachomatis* que carece de pCT e outros que apresentam deleções no genoma desta bactéria (28). Por essas razões passou a usar-se também em simultâneo como alvo o gene *ompI*, descartando a possibilidade de um resultado falso-negativo (22,24).

A técnica de MTR-PCR para a deteção de DNA de *C. trachomatis* descrita por Jalal *et al.* permite detetar, identificar e quantificar este microrganismo numa única reação a partir de três alvos de amplificação: o do gene do pCT para a deteção qualitativa, o gene da proteína da MOMP, para a quantificação do DNA, e um controlo interno (CI) para a deteção de inibidores de amplificação (22).

Em relação à deteção do genótipo LGV, em 2005 Morré *et al.* descrevem uma técnica NAAT que permite identificar estirpes LGV em duas horas. Os autores utilizam como alvo de amplificação o gene de proteína H da membrana polimórfica (*pmpH*), o qual apresenta numa região de deleção única de 36 pb específica destas estirpes, tornado esta técnica muito específica, embora não permita a diferenciação entre os diferentes genótipos L (60).

1.3.8 Genotipagem

A genotipagem é uma técnica útil para diferenciar estirpes, determinar redes de transmissão, estabelecer associações entre a doença e o agente patogénico ou para estudos patogénicos (14,18,38). Tradicionalmente a genotipagem de *C. trachomatis* foi efetuada pela utilização de anticorpos monoclonais específicos da proteína MOMP, denominando-se neste caso de serotipagem (33).

Atualmente, são utilizadas técnicas NAAT que se baseiam na amplificação do gene *omp1*, que com base nas variações das sequências nucleotídicas dos VD torna-se possível distinguir os vários genótipos (25,33). As sequências resultantes da amplificação do gene, após submissão a uma base de dados, Genbank, que contém sequências do gene *omp1* de genótipos conhecidos de *C. trachomatis*, possibilita, por comparação a identificação do genótipo presente na amostra (33).

1.3.9 Terapêutica da Infecção por *C. trachomatis*

Uma terapêutica correta permite a prevenção de complicações adversas para a saúde sexual e reprodutiva que podem ser provocadas pela infecção por *C. trachomatis* (26). Por outro lado o tratamento dos parceiros sexuais pode evitar a reinfeção, e o diagnóstico, e tratamento da mulher grávida impede a transmissão para o recém-nascido durante o parto (20,56).

As infeções urogenitais devem ser tratadas com azitromicina ou doxiciclina, dose única, durante sete dias sendo aconselhada a terapêutica do(s) parceiro(s) sexuais (56). No caso do LGV deve ser utilizada doxiciclina pelo período de três semanas (56).

1.4 Agente Etiológico - *Neisseria gonorrhoeae*

O género *Neisseria*, pertencente à família *Neisseriaceae*, compreende 11 espécies, das quais duas são patogénicas para o Homem, *N. gonorrhoeae* e *N. meningitidis* (61–63). As outras espécies encontram-se restritas ao trato respiratório superior, colonizando-o. Apesar de estarem estreitamente relacionadas com as espécies patogénicas raramente originam doença em indivíduos imunocompetentes (61,62).

N. gonorrhoeae, vulgarmente chamado gonococo, é o agente etiológico da gonorreia e infeta especificamente o Homem, com tropismo para o epitélio colunar e para as mucosas, sobretudo do trato urogenital inferior, podendo originar, sobretudo,

uretrite no sexo masculino e cervicite no sexo feminino após a contacto sexual com parceiro infetado (62–65). A transmissão também pode ocorrer por autoinoculação de secreções infetadas, ou por via perinatal (62,66–68).

Esta bactéria, que cora negativamente pela coloração de Gram, é aeróbica ou anaeróbia facultativa, não flagelada, não formadora de esporos, detentora da capacidade de oxidar os hidratos de carbono produzindo ácido (oxidase-positiva), capaz de decompor o peróxido de hidrogénio (catalase-positiva) e tipicamente disposta em pares (diplococos) com um lado côncavo, o que pela microscopia ótica sugere uma morfologia semelhante a um rim (61).

A infeção por *N. gonorrhoeae*, quando sintomática é caracterizada por uma resposta imunológica exacerbada, devido ao grande afluxo de leucócitos polimorfonucleados (PMN) no local de infeção, pelo que o exsudado resultante da infeção é rico nestes últimos (62,67,69,70). *N. gonorrhoeae* é um microrganismo patogénico que apresenta elevada capacidade de fuga e/ou adaptação às defesas do hospedeiro, devido à sua grande variabilidade fenotípica e genotípica (62,64,69,71). A variações genotípicas são adquiridas por transformação ou conjugação de material genético novo, e tal característica permitiu a esta bactéria a aquisição de plasmídeos produtores de penicilinas tornando-se resistente à penicilina (64,65,72).

O desenvolvimento de resistência a quase todos os antibióticos utilizados para o tratamento das infeções provocadas por este microrganismo é de grande preocupação, e teme-se que pode ser impossível efetuar terapêutica em determinadas circunstâncias (64,73–76). Por este facto é de extrema importância a implementação de sistemas de vigilância epidemiológica, para assim detetar associações entre o fenótipo/genótipo e a resistência aos antibióticos (72,73,76,77).

1.4.1 Factos Históricos

O termo gonorreia, de origem grega, foi introduzido por Galen. Este confundiu a secreção purulenta associada à uretrite gonocócica com sémen, sendo que “gonos” significa espermatozoide e “rhoia”, corrimento (61,70). Contudo, só em 1879 é que o microrganismo responsável por esta infeção foi descrito por Neisser como o agente etiológico da gonorreia, e em 1882, foi cultivado por Leistikow e Löffler (61).

1.4.2 Patogenicidade

A especificidade do hospedeiro, apresenta um problema para o desenvolvimento de modelos animais para o estudo da infecção provocada por *N. gonorrhoeae*, pelo que, a maioria do conhecimento sobre os mecanismos de patogenicidade resultam de investigações *in vitro* (63,67,69).

N. gonorrhoeae apresenta inúmeros mecanismos que inibem a ativação do complemento o que lhe permite escapar à fagocitose mediada pelos neutrófilos, apesar da existência de uma resposta inflamatória exacerbada por parte do hospedeiro (67,69,70).

A conversão génica é um mecanismo importante para a virulência de *Neisseria spp.* (62,69). Uma propriedade da espécie *N. gonorrhoeae* é a sua capacidade se adaptar aos antígenos de superfície com elevada rapidez e eficiência (62,64,69). Por outro lado, a formação de mutações pontuais permite-lhe invadir as células dos tecidos, interagindo com as células do sistema imunitário do hospedeiro suprimindo o desenvolvimento das respostas imunitárias (67,69).

N. gonorrhoeae para originar infecção no hospedeiro tem de ultrapassar as barreiras imunológicas deste, aumentando a sua suscetibilidade à infecção, tal aumento pode estar relacionado com a expressão e estrutura das adesinas, uma vez que estes componentes são necessários ao agente patogénico para a colonização inicial nas mucosas humanas e posterior invasão (62,63). Por outro lado, a estrutura *N. gonorrhoeae* contém LPS, o que lhe confere proteção aos mecanismos imunitários do hospedeiro, em que as suas proteínas de superfície (*pili*) desempenham um papel crítico na adesão inicial às células do hospedeiro, em associação com as proteínas da membrana externa (Opa) (62,63,78). Estas proteínas podem ter um papel importante no tropismo celular devido à capacidade de reconhecimento por parte das células hospedeiras, uma vez que a sua interação com estas pode ser moldada por moléculas específicas da membrana externa de bactérias gram-negativas (LOS) (62,63). A proteína reguladora do complemento, CD46 é expressa em todas as células nucleadas, a qual tem sido demonstrada como receptor para *pili*, auxiliando deste modo a invasão epitelial por *N. gonorrhoeae* (63).

Deste modo, existe uma necessidade de continua exploração dos fatores de virulência que permitem que esta bactéria invada e se adapte com êxito ao microambiente do hospedeiro (70,72,78).

1.4.3 Fatores de Risco

Os adultos jovens com idade igual ou inferior a 25 anos são um grupo de risco importante, responsáveis por 40% dos casos, sendo que a taxa mais elevada é observada no sexo masculino, na faixa etária dos 20-24 anos de idade (2,65,68).

O risco de adquirir a infecção após exposição à mesma, é maior no sexo feminino, uma vez que o microrganismo adere muito facilmente ao esperma (63,67,79). Contudo, a infecção está restrita a grupos populacionais com maior número de comportamentos sexuais de risco, como é o caso dos trabalhadores do sexo, dos jovens e dos HSH (2,65,67,76,80,81).

O risco de contrair a infecção aumenta, também devido a fatores sociais, e demográficos como múltiplos parceiros sexuais, o uso inconstante do preservativo, diagnóstico de IST no passado e/ou IST concomitante (64,67,68,76,82). O facto de ter tido uma infecção por *N. gonorrhoeae* aumenta a probabilidade de uma re-infecção (67,83).

1.4.4 Epidemiologia

Segundo a OMS e o ECDC a gonorreia é a segunda IST bacteriana mais comum no mundo e na Europa (2,8,67,84).

A OMS estimou para 2008 uma incidência mundial de infecção por *N. gonorrhoeae* de 106,1 milhões, tendo-se registado a maioria dos casos na Região Africana, com 3,4 milhões de casos na Europa (8,72).

Segundo o ECDC, em 2013 foi assinalada uma taxa de incidência de 17 casos de infecção por 100 000 habitantes em 28 países da UE/EEE, dos quais 61% no Reino Unido (46). Um aumento na notificação dos casos tem sido registado nos países da UE/EEE devido aos mesmos fatores da infecção por *C. trachomatis* (2,46).

O aumento mais pronunciado das taxas de incidência tem sido observado no sexo masculino, sendo que alguns países têm relacionado este aumento com o aumento

do número de HSH rastreados (46,80,81). Porém na globalidade dos países que registam os dados, a maioria da transmissão é de cariz heterossexual (46).

No que diz respeito à idade verifica-se que as taxas mais elevadas se encontram na faixa etária de jovens adultos entre 20-24 de idade (2,46,66,76). Esta tem sido consistentemente identificada como um fator de risco para a infeção pelo VIH (5,64,65,85,86).

O controlo da infeção por *N. gonorrhoeae* depende do uso de antibióticos (71–73). Contudo, este está atualmente a ser discutido devido ao aparecimento de resistência às cefalosporinas de terceira geração (ceftriaxona e cefixima), usadas atualmente no tratamento desta infeção (2,64,73,74,84,87).

Na Europa, existem planos de resposta de saúde pública para controlar a infeção por *N. gonorrhoeae* multirresistente, que detalham as ações necessárias e orientam intervenções, com o objectivo de minimizar o seu impacto de modo a tentar manter a gonorreia como infeção tratável, diminuindo a disseminação das estirpes resistentes (83,85,88). Estas ações passam sobretudo, pela oferta de uma deteção mais eficaz e consequente tratamento adequado (65,71,85).

Até ao momento não existem antibióticos alternativos para a terapêutica desta infeção, todavia os valores da concentração inibitória mínima (CIM) para a gentamicina (aminoglicosídeo) não mudaram ao longo dos anos, esta pode, portanto, no futuro ser uma potencial opção terapêutica (65,76,87,89).

Em Portugal, apesar da infeção por *N. gonorrhoeae* ser uma DDO a informação epidemiológica sobre a mesma é escassa (2,49,77). Porém muitos dos que existem dizem respeito a amostras populacionais generalizadas, pelo que as taxas de incidência são relativamente baixas, contradizendo a tendência europeia (51,54). Em relação à resistência antimicrobiana não há registos de estirpes que tenham apresentado resistência às cefalosporinas de terceira geração, o que suporta a estratégia do tratamento atualmente recomendado (77,90,91).

1.4.5 Manifestações Clínicas

N. gonorrhoeae pode causar vários tipos de infeções, sendo as mais frequentes a uretrite no sexo masculino e a cervicite no sexo feminino (34,64,66,72). Estas infeções

caracterizam-se originalmente por uma resposta inflamatória intensa dando origem a um corrimento purulento rico em PMN (66,67,70,92).

A infecção pode também ser assintomática, o que é mais comum no sexo feminino, ocorrendo em cerca de 50%-80% dos casos (2,34,67,72,79).

N. gonorrhoeae pode também infetar outras zonas anatómicas humanas, dependendo do comportamento sexual, como o reto e a orofaringe (71,72,92). Nestes casos são geralmente assintomáticas constituindo um importante reservatório para posterior transmissão e sendo predominantemente observadas em HSH (34,66,71,72,75).

Após o contacto sexual com um indivíduo infetado com *N. gonorrhoeae*, esta invade a mucosa, e após um período de incubação (2 a 5 dias) podem manifestar-se os sinais e sintomas clínicos (67,79,92). Estes são variados: no sexo masculino pode originar uma uretrite aguda caracterizada por um corrimento purulento e abundante acompanhado de disúria e poliúria a qual pode evoluir para epididimite aguda (66,79,92). No sexo feminino, a infecção localiza-se sobretudo no canal endocervical e origina cervicite, que por vezes se associa a uretrite. Sendo os sintomas predominantes corrimento vaginal, disúria e metrorragias (66,71,79,92). Esta quando não detetada e consequentemente não tratada atempadamente pode ascender ao trato genital superior e causar DIP com sequelas semelhantes às originadas pela infecção por *C. trachomatis* (61,65,67,71,79). A disseminação sanguínea resultando em meningite, artrite e septicemia, pode surgir como consequência da infecção em qualquer um dos géneros (61).

A partir da exposição a secreções vaginais durante o parto, o recém-nascido pode desenvolver conjuntivite neonatal (67,92). A infecção ocular nos adultos resulta da autoinoculação da conjuntiva de indivíduos com infecção genital (61,67).

1.4.6 Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico de gonorreia é efetuado pela identificação de *N. gonorrhoeae* nas secreções genitais ou extragenitais (57,66). Para um diagnóstico correto é necessário ter em conta diversos fatores como a colheita das amostras, transporte e armazenamento, uma vez estes que podem influenciar os resultados dos testes laboratoriais (34,66).

A colheita das amostras biológicas deve ser realizada nos locais anatómicos onde se localiza a infecção, quando esta é sintomática ou nos mais prováveis quando assintomática (56,57,72). Tal como para a pesquisa da infecção por *C. trachomatis*, os NAAT podem ser realizados com amostras de colheitas menos invasivas como a urina e exsudado vaginal (34,72,79,93).

1.4.6.1 Microscopia

A microscopia é um método de diagnóstico presuntivo, rápido e barato para o diagnóstico de gonorreia em indivíduos do sexo masculino sintomáticos com corrimento uretral. Neste caso podem visualizar-se diplococos corados negativamente pela técnica de Gram, intracelularmente nos leucócitos PMN, observados ao microscópio ótico (56,66,67). Nestes casos, o método é sensível (95%) e relativamente específico (80-95%) (66,94). Todavia, quando a observação é negativa não deve ser considerada suficiente para a exclusão (56,79).

O exame microscópico direto não é recomendado para o diagnóstico de infecções rectais, da orofaringe e exsudados cervicais devido ao grande número de outros microrganismos existentes nestas zonas e possível presença de outras espécies de *Neisseria spp.* (34,56,79).

1.4.6.2 Cultura

A cultura de *N. gonorrhoeae* é considerada a técnica padrão no diagnóstico laboratorial da infecção por esta bactéria, uma vez que é sensível (85-95%) e apresenta elevada especificidade, para além de que é o único método que permite efetuar os TSA (34,65–67,85). Está recomendada em doentes com sinais e sintomas sugestivos de infecção por *N. gonorrhoeae*, e sempre que possível quando na suspeita de infecção mesmo que assintomática (34,66,68,73).

Para a colheita as zaragatoas, de Dacron[®] devem ser inseridas 2-3 cm na uretra masculina ou 1-2 cm no canal endocervical, seguindo-se duas ou três rotações sendo que nos casos de uretrite, a colheita do exsudado é suficiente (34,59).

A cultura requer a presença de microrganismos vivos, e uma vez que *N. gonorrhoeae* é sensível às condições ambientais, esta deve ser efetuada de imediato ou não sendo possível devem ser usados meios de transporte que assegurem a sua

viabilidade, como é o caso de meios não nutritivos, como os meios de Stuart e Amies (59,67).

Os meios de cultura utilizados para o crescimento de *N. gonorrhoeae* devem ser seletivos para este microrganismo, como os meios de Thayer-Martin e New York City agar (59,67). Depois de inoculadas, as placas devem ser incubadas numa atmosfera húmida (70-80%) a uma temperatura de 36°C contendo 5% de CO₂ (34,56).

Quando a cultura apresenta crescimento pode realizar-se um diagnóstico presuntivo de infeção por *N. gonorrhoeae* efetuando-se o teste da oxidase (95). Aliado a este teste, a simples observação de colónias com morfologia típica em meios seletivos oferece informação suficiente para um diagnóstico presuntivo. Contudo, para o diagnóstico definitivo é necessário confirmar a identificação do microrganismo já que espécies estreitamente relacionadas podem estar presentes. A confirmação da identificação pode ser efetuada a partir de três abordagens distintas: o uso de testes bioquímicos como o API-NH, o uso de reagentes imunológicos ou a utilização de NAAT específicos para *N. gonorrhoeae* (34,96).

1.4.6.3 Testes de Amplificação de Ácidos Nucleicos - NAAT

Ao longo dos últimos anos foram desenvolvidos vários tipos de NAAT, cujas diferenças se baseiam na região específica DNA/RNA de *N. gonorrhoeae* a detetar (58,67,83).

Estes testes apresentam grandes vantagens, visto permitirem a pesquisa em amostras de colheita não invasiva, a manutenção do microrganismo não é tão necessária, para além de que são geralmente mais sensíveis do que a cultura (57,65,67,72,85). Possibilitam também reduzir as contaminações e a reatividade cruzada, sobretudo nas amostras da orofaringe e do reto, uma vez que nestas zonas se encontram espécies comensais (34,58,59,85,97–99). Apesar de não ser aprovado pela FDA (56). Porém impossibilitam a avaliação da suscetibilidade antimicrobiana (34,83).

Na seleção de um NAAT à que considerar que o seu valor preditivo positivo (VPP) seja maior que 90%, uma vez que a prevalência da infeção por *N. gonorrhoeae* afeta proporcionalmente a sensibilidade, a especificidade e o VPP do NAAT a usar (34,66,100). Sendo necessário o uso de um teste adicional confirmatório para todas as amostras positivas, aumentando o VPP (57,59,66).

A maioria dos NAAT tem como alvos de amplificação o gene *ccpB* do plasmídeo críptico (pJD1), o gene *opa*, o gene 16S rRNA ou o pseudogene *porA* (34,57,59,101). Estudos efetuados que utilizam este último demonstram melhores resultados de sensibilidade e especificidade, uma vez que este pseudogene parece estar ausente em espécies comensais de *Neisseria spp.* e é suficientemente diferente em *N. meningitidis* (57,102,103).

Um alvo comum utilizado nos testes de confirmação tem sido o gene *ccpB* do pJD1, presente em cerca de 96% das estirpes de *N. gonorrhoeae*, sendo que o produto deste gene existe também em estirpes que não possuem este pJD1 (34,57). A especificidade da técnica anterior deve ser confirmada por uma técnica de digestão com enzima de restrição – RFLP (do inglês, *restriction fragment length polymorphism*) a partir da presença de um local de restrição da sequência amplificada do gene *ccpB*, utilizando a enzima de restrição *MspI* e obtendo dois fragmentos (250 pb e 140 pb) (104).

1.4.7 Terapêutica da Infecção por *N. gonorrhoeae*

O aparecimento da resistência aos antibióticos, teve início desde o primeiro momento em que a terapia antimicrobiana foi usada no tratamento da infecção por *N. gonorrhoeae* (67,72,85,91). Principalmente devido elevada capacidade de transformação e conjugação, adquirindo plasmídeos e mutações pontuais espontâneas em resposta à pressão exercida pelos mesmos (64,72,91).

De tal modo, a vigilância e o uso racional dos antibióticos é necessária para o controlo da infecção e para a diminuição do aparecimento de resistências, existindo a necessidade de procurar novas alternativas e novos agentes antibacterianos (2,64,66,73,84).

Atualmente as diretrizes do tratamento antibiótico de primeira linha recomendam o uso de cefalosporinas de terceira geração juntamente com azitromicina (56). Existe uma base teórica para a terapia de combinação utilizando dois agentes antimicrobianos com diferentes mecanismos de ação para melhorar a eficácia do tratamento e, potencialmente, retardar o aparecimento e disseminação das estirpes resistentes às cefalosporinas que começam a surgir (72,84,88). Muitas vezes os indivíduos infetados por *N. gonorrhoeae* apresentam também infecção por *C.*

trachomatis, pelo que estes devem ser tratados com um regime eficaz contra a infeção por *C. trachomatis*, sustentando a utilização da terapêutica dupla (56,105).

Porém, encontram-se em circulação estirpes associadas a diminuição da suscetibilidade às cefalosporinas de terceira geração, resultando em falhas no tratamento destas infeções (66,67,73). Como tal, a OMS bem como o ECDC publicaram um plano de controlo da resistência antimicrobiana em *N. gonorrhoeae* salientando a importância de vigiar as estirpes resistentes (87,106).

1.5 Indicações para o Rastreio

A propagação de uma IST na população está dependente de três parâmetros: da probabilidade de transmissão, da taxa de contacto e da duração da infeção (107). O controlo das IST envolve uma série de atividades, tais como a prevenção primária envolvendo jovens adultos a partir da educação sexual, a promoção do uso do preservativo e comportamentos sexuais mais seguros, diagnóstico e tratamento eficaz, identificação e tratamento dos parceiros, rastreio para identificação e tratamento de casos assintomáticos (1,20,47,56,107).

O rastreio de IST tem como principal objetivo controlar e interromper a transmissão, de modo que a sua incidência diminua, e assim prevenir as consequências destas infeções e diminuir os custos económicos, físicos e psicológicos a elas associados (1,59,107). Sendo particularmente importante em populações onde a prevalência da infeção é elevada (56,66,108). Por outro lado as IST são um co-fator importante para a infeção por VIH, aumentando a suscetibilidade e a infeciosidade do vírus, pelo que o seu diagnóstico precoce contribui para o controlo do VIH (56,109,110).

Segundo o CDC (do inglês *Centers for Disease Control and Prevention*) a prevalência da infeção diminui para cerca de metade após a implementação de rastreios em locais onde existem cuidados de saúde primários (59,111).

Atualmente, o rastreio da infeção por *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* é simples, não invasivo e indolor, o que o torna mais acessível e aceitável para a população em geral (34,56,67,72). O método de diagnóstico recomendado para a pesquisa daqueles microrganismos são os NAAT, e a colheita das amostras biológicas efetuada por autocolheita; urina no sexo masculino e exsudados vaginais no sexo

feminino, demonstrando elevada sensibilidade e especificidade (26,34,41,56–58). Sendo que amostras de urina também são aceitáveis no sexo feminino, mas podem detetar até menos de 25% das infeções devido a ausência da bactéria na uretra (66,72,112).

No caso do rastreio para *C. trachomatis* o CDC recomenda, anualmente em todos os indivíduos do sexo feminino sexualmente ativos com menos de 25 anos, assim como indivíduos de ambos os géneros com fatores de risco, tais como novos parceiros nos últimos 90 dias ou múltiplos parceiros sexuais e/ou o uso inconstante do preservativo (26,40,43,56,113). Não há evidência suficiente com base na viabilidade e custo-eficácia, para que este esteja recomendado em jovens indivíduos do sexo masculino sexualmente ativos (56). No entanto, estes devem ser considerados em situações clínicas associadas à alta prevalência da infeção como por exemplo, clínicas de IST e estabelecimentos prisionais (26,56,113). Como a população de risco para a infeção por LGV é diferente, o rastreio anual está recomendado em HSH sexualmente ativos (56).

Relativamente à infeção por *N. gonorrhoeae*, atualmente o rastreio está anualmente recomendado pelo CDC a todos os indivíduos do sexo feminino sexualmente ativos com menos de 25 anos, bem como a todos aqueles que tenham comportamentos de risco e/ou fatores intrínsecos favoráveis à transmissão e aquisição de infeção (56,72). Porém as recomendações para o rastreio desta infeção na Europa, são que este é recomendado a indivíduos de ambos os sexos que sejam sexualmente ativos com menos de 25 anos de idade (66). Uma vez que, a prevalência das infeções provocadas por *N. gonorrhoeae* varia muito entre grupos-populacionais, pode haver necessidade de considerar a epidemiologia local, sendo que a sua generalização não é recomendada quando comparados custos e eficácia (56,114).

IST de localização extragenital são comuns em determinados grupos populacionais, como HSH (72,115,116). Estes são, portanto, um grupo populacional importante para recomendar rastreio, não só devido à suscetibilidade da mucosa rectal aos patógenos que provocam estas infeções, como o facto de apresentarem elevados comportamentos de risco (56,72,86,117). Outro grupo a considerar é o das mulheres grávidas que devem ser pesquisadas por rotina para a infeção por *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* durante a primeira consulta pré-natal (56).

Quando o rastreio de IST é realizado numa população com baixa prevalência da infeção, o CDC recomenda que se realize um teste adicional rotineiramente após um teste positivo, visando melhorar o VPP (56,59).

1.6 Enquadramento e Objetivos

Na Europa é notório um crescente aumento dos países que referem infeções por *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* (2). Contudo, amostras representativas das populações nacionais estão limitadas aos países do Norte e da Europa Central (2,46).

A maioria dos estudos de prevalência de infeções por *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* realizados um pouco por todo o mundo são sobretudo entre populações que procuram cuidados de saúde em clínicas especializadas para IST ou em consultas de planeamento familiar, sendo o mesmo padrão verificado em Portugal (51,54,114,118–120). Podendo, portanto estas infeções disseminarem-se de uma forma silenciosa em populações que não procuram cuidados de saúde específicos (51).

Um padrão constante neste tipo de estudos em relação à incidência da infeção por *C. trachomatis* é que esta apresenta valores muito variados que dependem dos fatores demográficos de estudo para estudo (121).

Assim como, estudos que revelam taxas de prevalência normalmente baixas, para a infeção por *N. gonorrhoeae* quando se nota um aumento da sua incidência, tal pode estar relacionado com o facto de a população mais susceptível a este tipo de infeções não procurar estes cuidados de saúde, logo não ser inserida nos estudos (120).

Para que a implementação de medidas preventivas e, eventualmente, um programa de rastreio tenha eficácia, é essencial avaliar as atitudes dos grupos alvo, assim como ter uma estimativa da prevalência da infeção nesses mesmos grupos (2,43,107).

Desta forma, dada a pouca informação sobre estudos de prevalência de agentes bacterianos como o *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* e o facto de existirem poucos dados sobre a população de risco em Portugal, bem como a forma como todos estes fatores pode influenciar a aquisição de infeções, e tendo em vista uma futura implementação de medidas preventivas e/ou de um programa de rastreio em Portugal, os objetivos do presente estudo foram:

- ✓ Determinar a frequência da infeção por *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* em grupos populacionais de diferentes áreas da região de Lisboa, Loures e Odivelas;
- ✓ Identificar os genótipos de *C. trachomatis*;
- ✓ Identificar a presença de co-infeções entre as infeções estudadas e outras IST;
- ✓ Identificar relações entre características sociodemográficas, comportamentais e clínicas com o risco de infeção por *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae*;
- ✓ Verificar a necessidade de avaliar as medidas de prevenção e controlo da infeção urogenital por *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Caracterização da População Estudada

O presente estudo apresenta uma estrutura de um estudo de natureza transversal.

A aleatoriedade da população inquirida foi assegurada pelo voluntariado do próprio indivíduo, uma vez que o método de amostragem de eleição para este tipo de estudo é um método de amostragem probabilística aleatória.

As amostras analisadas foram provenientes de indivíduos de ambos os sexos que aderiram a um rastreio voluntário de Infecções Sexualmente Transmissíveis (IST), a decorrer em duas instituições: a Liga Portuguesa Contra a Sida (LPCS) e o Centro de Acolhimento e Orientação à Mulher das Irmãs Oblatas (CAOMIO), no período compreendido entre Setembro de 2013 e Junho de 2015. A LPCS tem uma Unidade Móvel de Rastreios (UMR) que, no âmbito do programa "Saúde + Perto", se desloca a diferentes zonas de Lisboa, Loures e Odivelas de modo a proporcionar o rastreio à população considerada de maior risco de aquisição de IST. Por outro lado, no CAOMIO o rastreio foi efetuado no decorrer do projeto "In Mouraria" e pretendeu também abranger população mais suscetível, nomeadamente trabalhadores do sexo.

A todos os voluntários que aderiram ao estudo foi efetuada explicação dos objetivos do mesmo, aconselhamento pré e pós teste e pedido que assinassem uma declaração de consentimento informado.

2.2 Critérios de Exclusão

Foram excluídos os participantes que apenas realizaram pesquisa de anticorpos anti-VIH (vírus da imunodeficiência humana) por teste rápido.

2.3 Recolha dos Dados Demográficos

A cada voluntário foi entregue a um questionário composto por três segmentos: colheita de características sociodemográficas, história da sua vida sexual e história atual da IST (Anexo I).

A informação presente no questionário gerou variáveis estatísticas para posterior caracterização e estudo da amostra. Estas foram analisadas e tratadas com recurso ao programa estatístico PASW (do inglês, *Predictive Analytics Software Statistics*)

(International Business Machines Corporation – IBM, Chicago, Estados Unidos da América), versão 18.0.

O teste do Qui-Quadrado foi usado para análise da independência no cruzamento de variáveis qualitativas, eventualmente quando não se verificaram as condições de aplicabilidade do teste do Qui-Quadrado usou-se o teste exacto de Fisher.

O teste de Mann-Whitney-Wilcoxon foi usado na comparação das funções de distribuição em dois grupos independentes em alternativa ao teste T-Student, uma vez que os pressupostos deste não se verificaram.

Para a análise exploratória dos dados obtidos utilizou-se a estatística descritiva e os testes de hipóteses para um nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$).

O programa Epitools (122) foi também utilizado para obter os intervalos de confiança a 95% para as diversas frequências de infeção (FI) com interesse. Para o Intervalo de Confiança (IC) a 95% foi usado o método de Wilson (123), e este foi também usado para o cálculo do Risco Relativo (RR).

2.4 Desenho do Estudo

Para a realização deste estudo foram efetuadas colheitas de amostras biológicas para a deteção de ácido desoxirribonucleico (DNA do inglês *Deoxyribonucleic Acid*) de *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae*, e para a realização de testes serológicos para pesquisa de anticorpos anti-*T. pallidum*, anti-VHC (vírus da hepatite C), anti-VIH e antígenos de superfície do vírus da hepatite B (AgHBs).

A identificação de DNA de *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* foi efetuada em amostras de urina e em exsudados (vaginais e uretrais) com recurso a uma técnica de PCR Multiplex em Tempo Real (MTR-PCR, do inglês *Multiplex real-time Polymerase Chain Reaction*), executada em duplicado para cada amostra biológica.

As amostras com uma identificação de DNA positivo para *C. trachomatis* foram posteriormente submetidas a uma técnica de *Nested-PCR*, a fim de serem enviadas para sequenciação, com o objetivo de identificação do genótipo presente. As amostras com identificação de DNA positivo para *N. gonorrhoeae* foram submetidas a uma segunda técnica de PCR com o objetivo de confirmar a especificidade da técnica anterior.

Os testes serológicos foram realizados em todas as amostras de soro/plasma.

2.5 Colheita e Preparação das Amostras Biológicas

Aos participantes incluídos no estudo foram colhidas amostras de urina, se do sexo masculino e exsudado vaginal se do feminino, e soro/plasma em ambos os gêneros. Na presença de sintomatologia de uretrite efetuou-se colheita de exsudado uretral.

No processo da colheita e transporte das amostras de urina e exsudados foram seguidas as normas do CDC (do inglês *Centers for Disease Control and Prevention*) e da Organização Mundial de Saúde (OMS) (34,56).

As amostras de urina foram obtidas por autocolheita do participante, através da colheita do primeiro jacto (~15ml) para um recipiente asséptico, com um intervalo mínimo de uma hora desde a última micção. Estas foram armazenadas entre 2° e 8°C até serem transportadas para o laboratório. No seu processamento, as urinas foram centrifugadas (*Centrifuge 5810R*, Eppendorf Ag, Germany) a 4000 rpm durante 45 minutos a uma temperatura de 4°C. O sobrenadante foi desprezado, e o sedimento após homogeneizado no vortex (*MS2 Minishaker*, IKA® Works Inc., USA) foi dividido em alíquotas de 400µl e 1,5ml, respetivamente para a extração de DNA e para congelar a -80°C para posterior utilização, se necessário.

As amostras de exsudados vaginais e uretrais foram também obtidas por autocolheita, com o auxílio de zaragatoas de Dacron®, imediatamente colocadas em meio de transporte 2SP (sacarose-fosfato) estéril e refrigeradas entre 2° a 8°C até à chegada ao laboratório. Para o processamento, após a zaragatoa ter sido descartada, as amostras biológicas foram homogeneizadas no vortex (*MS2 Minishaker*, IKA® Works Inc., USA). Foi retirado a cada tubo 250µl do seu conteúdo para posterior extração de DNA sendo o restante armazenado a -80°C.

Para obtenção das amostras de soro/plasma, foi efetuada colheita por punção venosa quer para tubo com anticoagulante quer para tubo sem anticoagulante, em condições de assépsia. No primeiro caso obteve-se plasma o qual foi dividido em duas alíquotas, uma usada de imediato e outra armazenada a -20°C. As amostras colhidas para tubo sem anticoagulante e após repouso durante 20 a 60 minutos para retração do coágulo, foram sujeitas a uma centrifugação (*Labofuge200*, Heraeus Instruments, Germany) a 2000 rpm durante 10 minutos à temperatura ambiente. O soro obtido foi também dividido em alíquotas e tratadas da mesma forma que a amostra de plasma.

2.6 Extração de DNA das Amostras de Urina e Exsudados

A todas as amostras de urina e exsudados, o DNA total foi extraído recorrendo ao sistema comercial *JetQuick® Genomic DNA Purification Kits* (Genome GmbH, Germany), segundo o protocolo “*Purifying gDNA from Blood and Body Fluids Using Centrifugation*”.

Antes de realizar a extração, foi adicionado em todas as amostras 3µl de uma solução de controlo interno (CI) (TIB MOLBIOL, Quilaban, Berlim) com uma diluição de 1:5000, cujo objetivo foi controlar o processo de extração do DNA bem como detetar a presença de inibidores da reação de amplificação. O CI residiu numa sequência de oligonucleotídeos sintética de 100bp (5'- GTG CTC ACA CCA GTT GCC GCG GAA AGT ATG TGG AAT GTT AAC ACA CCC ACC ACA CCC ACA CAC GTG TTG ATC AAT TTC GAG ATG CGA GCT GCC AAG C -3').

A metodologia da extração para ambos os tipos de amostras biológicas estudadas, foi realizada conforme as instruções do fabricante. Salvo duas exceções, a primeira nas amostras de urina, uma vez que foram utilizados 400µl de sedimento urinário em vez de 200µl, e a segunda no passo final do processo de extração, aquando da colocação do tampão de eluição, uma vez que foram usados 75µl deste, ao invés dos 200µl sugeridos.

Este sistema comercial é constituído por vários componentes necessários à extração, sendo que, neste caso, o tampão de eluição utilizado foi o tampão AE (Tris-HCl, 10mM, pH 8,5) (QIAGEN GmbH, Germany). Baseia-se na ligação do DNA total à membrana da coluna, seguindo-se uma série de lavagens para a sua purificação, e por fim um passo de eluição do DNA da membrana. Após a sua recuperação, o DNA foi dividido em alíquotas, sendo uma utilizada de imediato e a(s) restante(s) congelada(s) a -20°C.

2.7 Pesquisa de DNA de *C. trachomatis*

2.7.1 Técnica de PCR – Multiplex em Tempo Real

A técnica de MTR-PCR foi realizada com base na descrita por Jalal *et al.* (2006), a qual utiliza três pares de *primers* e três sondas oligonucleotídicas numa mesma mistura de reação, para posterior amplificação de três alvos distintos (22). Os

pares de *primers* HJ-plasmid-1/HJ-plasmid-2 e HJ-MOMP-1/HJ-MOMP-2 têm como alvo de amplificação respectivamente o plasmídeo críptico (pCT) e o gene *omp1* de *C. trachomatis*, enquanto que o par CI-F/CI-R, tem como alvo de amplificação o CI. A identificação dos produtos amplificados foi efetuada pelas sondas TaqMan[®], ROX-PI para o pCT, sonda Yak- MOMP para o *omp1* e sonda Cy5-CI para o CI. Os *primers* e as sondas utilizados estão descritos na tabela 3 tendo sido comercializados pela casa comercial TIB MOLBIOL[®], Quilaban, Berlim.

Tabela 3 - *Primers* e sondas utilizados na técnica de MTR-PCR para deteção de DNA de *C. trachomatis*

Código de <i>Primer</i> e Sonda	Sequência	Gene Alvo
HJ-plasmid-1	5'-AAC CAA GGT CGA TGT GAT AG-3'	pCT
HJ-plasmid-2	5'- TCA GAT AAT TGG CGA TTC TT-3'	
ROX-PI	5'-ROX-CGA ACT CAT CGG CGA TAA GG- BBQ--3'	
HJ-MOMP-1	5'-GAC TTT GTT TTC GAC CGT GTT-3'	MOMP
HJ-MOMP-2	5'-ACA RAA TAC ATC AAA RCG ATC CCA-3'	
Yak- MOMP	5'-YAK-ATG TTT ACV AAY GCY GCT T- BBQ-3'	
CI-F	5'-GTG CTC ACA CCA GTT GCC GC-3'	Controlo Interno
CI-R	5'-GCT TGG CAG CTC GCA TCT CG-3'	
Cy5-CI	5'-Cy5-ATT GTG TGG GTG TGG TGT GGG TGT GTG C- - BBQ-3'	

Primeiramente, foi realizada uma mistura de reação com um volume total de 18µl num compartimento físico em câmara de luxo laminar (NuAire, USA), utilizando-se água milli-Q (Merck Millipore), *primers*, sondas, e uma mistura reacional comercializada (*SensiMix™ II Probe Kit*, Bioline, Germany), a qual contém os restantes reagentes necessários à reação de amplificação, incluindo uma DNA polimerase do tipo “hot-start”. As condições desta reação encontram-se esquematizadas na tabela 4.

Tabela 4 – Condições da técnica de MTR-PCR para a detecção de DNA de *C. trachomatis*

Reagentes	Cf (μM)	V (μl)
Água milli-Q	-	4,06
Primer HJ-plasmid-1	0,4	0,3
Primer HJ-plasmid-2	0,4	0,3
Primer HJ-MOMP-1	0,4	0,3
Primer HJ-MOMP-2	0,4	0,3
Primer CI-R	0,4	0,3
Primer CI-F	0,4	0,3
Sonda ROX-PI	0,2	0,36
Sonda Yak-MOMP	0,2	0,36
Sonda Cy5-CI	0,2	0,36
SensiFast	-	8
DNA	-	3,6

Cf = Concentração final; V = Volume pipetado; *SensiFast*TM (Bioline, Germany)

Para cada ensaio foram realizados dois controlos negativos (CN), nos quais o DNA foi substituído por água milli-Q (Merck Millipore), um controlo positivo (CP) constituído por DNA de uma estirpe de referência de *C. trachomatis* serotipo L2, extraído de uma cultura de células McCoy, cedida pelo Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (estirpe L2434B). Para verificação da amplificação do CI, utilizou-se um controlo de amplificação, sendo este o produto resultante de uma extração efetuada a partir de uma amostra de água milli-Q (Merck Millipore) adicionada de 3 μl de CI diluído a 1:5000.

Os CN permitiram obter um limiar dos resultados negativos (threshold) correspondente à não existência da amplificação. A validação das condições de reação de PCR foi efetuada pela visualização da curva de amplificação do CP, assim como a do CI.

A reação de amplificação foi executada no termociclador *Rotor-Gene 3000* (Corbett Robotics, Austrália). O perfil da reação de amplificação incluiu aquecimento a 95°C durante 10 minutos seguido de 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos e 60°C durante 60 segundos. A aquisição do sinal para cada um dos três canais foi realizada a 60°C durante cada ciclo. Os resultados da amplificação foram visualizados em três gráficos distintos correspondendo cada um deles ao respetivo sinal de cada sonda em cada canal: JOE (MOMP), ROX (pCT) e Cy5 (CI).

As amostras consideradas positivas para a pesquisa de DNA de *C. trachomatis* foram aquelas em que a sua curva de amplificação cruzou o limiar nos dois canais (JOE

e ROX) (Figura 2). Contudo quando apenas houve sinal de amplificação num dos canais (JOE ou ROX) a amostra foi considerada indeterminada para pesquisa de DNA de *C. trachomatis*, sendo posteriormente estudada por outra técnica (*Nested-PCR*).

As amostras consideradas negativas para pesquisa de DNA de *C. trachomatis* foram aquelas em que não se observou sinal de amplificação nos canais JOE e ROX.

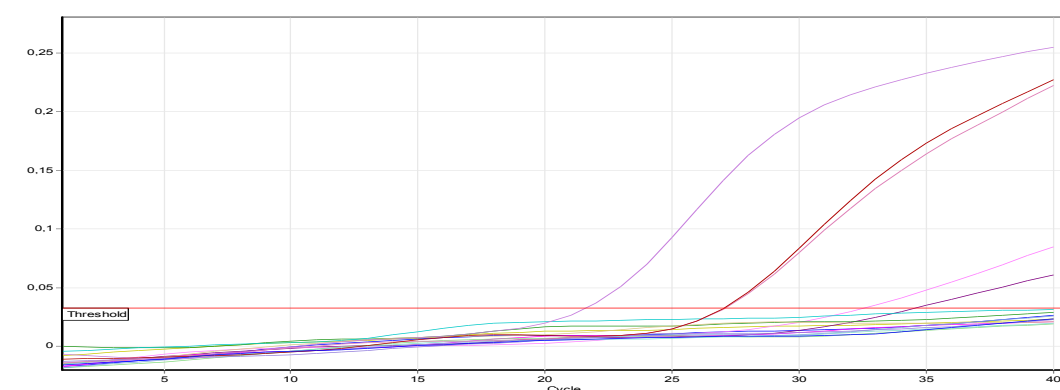


Figura 2. Resultado da amplificação correspondente ao sinal de fluorescência no canal JOE, através da técnica de PCR – Multiplex em Tempo Real de diversas amostras clínicas.

Amostras positivas: cor-de-vinho, rosa, rosa-choque e roxo; Amostras negativas: verde, amarelo, amarelo-torrado, azul-claro, azul-escuro, rosa-violeta; Controle positivo: violeta; Controle negativo: verde-água

2.7.2 Técnica de PCR em Tempo Real para Identificação do Serotipo L (LGV)

Uma técnica de PCR em Tempo Real (TR-PCR, do inglês *real-time Polymerase Chain Reaction*) para a identificação do serotipo L de *C. trachomatis* foi realizada com base na técnica descrita por Morré *et al.* (2005) (60). Esta realizou-se igualmente no termociclador *Rotor-Gene 3000* (Corbett Robotics, Austrália), para todas as amostras onde foi detetada a presença de DNA de *C. trachomatis* pela técnica de MTR-PCR.

O gene da proteína de membrana H polimórfica, *pmp* foi usado como gene alvo da amplificação. Os *primers* usados foram LGV-s3: 5'-TCC TTT ATC TAC TGT GCC AAC C-3' e LGV-B: 5'-CAG AAA AAA TAG ACC CTT TCC GAG-3' e a sonda (TaqMan®) LGV-TM: 5'-6FAM-CAA CTC CGC CTG CTC CAA CAG T-DB 3', também comercializados por TIB MOLBIOL®, Quilaban, Berlim.

As condições da mistura de reação para esta técnica encontram-se esquematizadas na tabela 5, para um volume total de 18 µl, sendo esta realizada num compartimento físico em câmara de luxo laminar (NuAire, USA), tendo também utilizado a mistura reacional comercializada já referida (2.7.1).

Tabela 5 - Condições da técnica de RT-PCR para a detecção do serotipo L de *C. trachomatis* em amostras positivas pela técnica de MTR-PCR

Reagentes	Cf (μM)	V (μl)
Água milli-Q	-	4,24
Primer LGV-B	0,4	0,72
Primer LGV-S3	0,4	0,72
Sonda LGV-TM	0,2	0,72
SensiFast	-	8
DNA	-	5

Cf = Concentração final; V = Volume pipetado; *SensiFast*TM (Bioline, Germany)

Também neste caso para cada ensaio foram incluídos dois CN, um CP e um controlo para o CI iguais e com os objetivos anteriormente referidos (2.7.1).

O perfil de amplificação no termociclador compreendeu aquecimento 10 minutos a 95°C e 45 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 62°C.

Uma amostra clínica foi considerada positiva para a pesquisa do serotipo LGV de *C. trachomatis* quando se observou uma curva de amplificação que cruzou o limiar.

2.7.3 Genotipagem – Técnica de *Nested*-PCR

Todas as amostras em que foi detetada a presença de DNA de *C. trachomatis* pela técnica de MTR-PCR, ou as que se revelaram indeterminadas por essa mesma técnica foram submetidas a uma técnica de *Nested*-PCR, adaptada de Yang *et al.* (1993) (25). Esta metodologia consistiu em duas amplificações na sequência uma da outra, sendo a primeira a amplificação de um fragmento do gene *omp1*, seguida de uma segunda a amplificação de um fragmento interno ao primeiro. A primeira amplificação (*Outer*-PCR) consistiu na amplificação de um fragmento de 1142 pb, para tal utilizaram-se os *primers* OMP1 e OMP2 e para a segunda (*Inner*-PCR) cujo o objetivo foi amplificar um fragmento com 879 pb, usaram-se os *primers* OMP3 e OMP4.

As sequências dos *primers* utilizados foram comercializadas por InvitrogenTM, TermoFisher SCIENTIFIC, USA e encontram-se descritas na tabela 6.

Tabela 6 - *Primers* utilizados na técnica de *Nested-PCR* para detecção de um fragmento do gene *omp1* de *C. trachomatis*

Código dos primers	Sequência	Tamanho do fragmento amplificado
OMP1	5'- GCC GCT TTG AGT TCT GCT TCC TC -3'	1142 bp
OMP2	5'- ATT TAC GTG AGC AGC TCT CTC AT -3'	
OMP3	5'-TGA CTT TGT TTT CGA CCG TGT TTT-3'	879 bp
OMP4	5'-TTT TCT AGA TTT CAT CTT GTT CAA YTG-3'	

Os controles usados (CP e CN) foram os mesmos usados nas técnicas anteriormente descritas (2.7.1).

As condições da mistura de reação de *Outer-PCR* (para um volume final de 25µL) encontram-se esquematizadas na tabela 7, esta foi realizada num compartimento físico em câmara de luxo laminar (NuAire, USA).

Tabela 7 - Condições de *Outer-PCR*

Reagentes	Cf	V (µl)
Água milli-Q	-	16,45
10X PCR Buffer-MgCl ²	1X	2,5
dNTPs	4µM	2
50mM MgCl ₂	1,5mM	0,75
Primer OMP1	0,5µM	0,5
Primer OMP2	0,5 µM	0,5
Taq DNA pol	0,25 U	0,3
DNA	-	2

Cf= Concentração final; V= Volume pipetado; Primers (Invitrogen™, USA); *Taq* DNA polymerase (*BIOTAQ™ DNA polymerase*, Bioline, UK); 10X PCR Buffer-MgCl²-Tampão de reação (Bioline, UK); MgCl₂ - cloreto de magnésio (Bioline) dNTPs - Desoxirribonucleótidos (Amersham Pharmacia Biotech, Ge Helthcare, EUA)

Ambas as reações de amplificação foram realizadas no termociclador *Master Cycle Personal* (Eppendorf, USA). Sendo que, a primeira com o seguinte perfil de amplificação: 95°C durante 5 minutos, 34 ciclos a 95°C durante 1 minuto e 30 segundos, 60°C durante 2 minutos e 30 segundos, 72°C durante 3 minutos e um ciclo final a 72°C durante 10 minutos.

A partir do produto de amplificação resultante da primeira reação (*Outer-PCR*), a mistura reacional da 2ª amplificação (*Inner-PCR*) realizou-se igualmente num

compartimento físico em câmara de luxo laminar (NuAire, USA), com um volume final de 50µl cujas as condições de mistura de reação que se encontra esquematizada na tabela 8.

Tabela 8 - Condições de *Inner*-PCR

Reagentes	Cf	V (µl)
Água milli-Q	-	37
10X Tampão de reação	1X	5
dNTPs	4µM	2
50mM MgCl ₂	1,5mM	1,5
Primer OMP4	0,5µM	1
Primer OMP4	0,5 µM	1
Taq DNA pol	0,25 U	0,5
Produto de amplificação do <i>Outer</i> -PCR	-	1-2*

Cf= Concentração final; V= Volume pipetado; Primers (Invitrogen™, USA); *Taq* DNA polymerase (*BIOTAQ™ DNA polymerase*, Biotline, UK); 10X PCR Buffer-MgCl₂-Tampão de reação (Biotline, UK); MgCl₂ - cloreto de magnésio (Biotline) dNTPs - Desoxirribonucleótidos (Amersham Pharmacia Biotech, Ge Helthcare, EUA)

* Depende da maior ou menor quantidade amplificada na reação de *outer*-PCR

O perfil de amplificação para a reação de *Inner*-PCR foi o seguinte: 1º ciclo a 95°C durante 5 minutos, 40 ciclos a 95°C durante 1 minuto, 62°C durante 1 minuto, 72°C durante 1 minuto e um ciclo final a 72°C durante 10 minutos.

Posteriormente à obtenção do produto amplificado, procedeu-se a sua visualização. Esta foi realizada após separação em electroforese em gel de agarose a 1,5% (*Agarose Molecular Grade*, Biotline) com uma concentração de brometo de etídeo 0,5µg/ml (Fluka® Analytical), para a técnica de *Outer*-PCR (1ª amplificação) e em gel de agarose a 2% (*Agarose Molecular Grade*, Biotline) com uma concentração de brometo de etídeo 0,5µg/mL (Fluka® Analytical) para a técnica de *Inner*-PCR (2ª amplificação). O tamanho dos fragmentos amplificados foi identificado por comparação com o padrão de migração dos marcadores de peso molecular, *100 pb DNA Ladder Plus* e *HyperLadder II* (Biotline, UK) para a técnica de *Outer*-PCR e *Inner*-PCR, respetivamente. Em ambos os PCR utilizou-se 10µl de produto amplificado misturado com 3µl de uma solução saturada de sacarose corada com azul de bromofenol (Fermentas, UK).

Os géis foram submetidos a uma fonte de corrente elétrica (*Power Pac 300*, BioRad, USA) de 100V e 50A durante 60 minutos, numa tina de electroforese (*BioRad Sub-Cell® GT*, Hemel Hempstead, UK) em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 0,5X

(National Diagnostics, USA). Os fragmentos de DNA foram visualizados por exposição do gel à radiação ultravioleta (BioRad, Italy), sendo posteriormente, a imagem capturada num aparelho fotográfico incorporado (*Gel-Doc XR*, BioRad, USA) e visualizada através do programa *Quantity One*, version 4.5.0.

Aquando da análise dos resultados, um resultado positivo foi considerado quando visualizado um fragmento de 879bp no produto da 2ª amplificação, sendo que o produto da 1ª amplificação utilizou-se para calcular a quantidade de produto amplificado resultante da reação *Outer*-PCR a colocar para a técnica de *Inner*-PCR (2ª amplificação).

Todas as amostras positivas avaliadas por esta técnica foram enviadas à empresa STAB VIDA (Almada, Portugal) para serem sequenciadas em ambas as direções (direta e reversa). Após recepção das sequências, estas foram editadas e alinhadas no programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* (version 7.0.9.0), e posteriormente submetidas a um algoritmo BLAST (do inglês, *Basic Local Alignment Search Tool*) do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, que permitiu a comparação com sequências de genótipos conhecidos de *C. trachomatis* existentes na base de dados *Genbank*, identificando-se desta forma o genótipo presente em cada amostra.

2.8 Pesquisa de DNA de *N. gonorrhoeae*

2.8.1 Técnica de PCR - Multiplex em Tempo Real

A técnica de MTR-PCR foi realizada com base na descrita por Whiley *et al.* (2004), tendo como alvo de amplificação um fragmento do pseudogene *porA* de *N. gonorrhoeae* (103). Os *primers* e as sondas TaqMan® utilizados estão descritos na tabela 9, e foram comercializados pela casa comercial TIB MOLBIOL, Quilaban, Berlim.

Tabela 9 – *Primers* e sondas utilizados na técnica de MTR-PCR para a detecção de DNA de *N. gonorrhoeae*

Código de <i>Primer</i> e Sonda	Sequência	Gene Alvo
NG-Pap-F	5'- CGG TTT CCG TGC GTT ACG A -3'	<i>porA</i>
NG-Pap-R	5'- CTG GTT TCA TCT GAT TAC TTT CCA -3'	
NG-PAP TM	5'-6FAM- AAG TAG CAG GCG TAT AGG CGG ACT TGC- - DB-3'	Controlo Interno
CI-F	5'-GTG CTC ACA CCA GTT GCC GC-3'	
CI-R	5'-GCT TGG CAG CTC GCA TCT CG-3'	
Cy5-CI	5'-Cy5- ATT GTG TGG GTG TGG TGT GGG TGT GTG C- - BBQ-3'	

A reação de PCR foi realizada utilizando a mistura reacional comercializada (*SensiMix™ II Probe Kit*, Bioline, Germany) já referida, para um volume total de 18µl com as condições esquematizadas na tabela 10, num compartimento físico em câmara de luxo laminar (NuAire, USA).

Tabela 10 - Condições da técnica de MTR-PCR para a detecção de DNA de *N. gonorrhoeae*

Reagentes	Cf (µM)	V (µl)
Água milli-Q	-	2,68
<i>Primer</i> NG-R	0,4	0,96
<i>Primer</i> NG-F	0,4	0,96
<i>Primer</i> CI-R	0,1	0,36
<i>Primer</i> CI-F	0,1	0,36
Sonda NG-TM	0,2	0,72
Sonda Cy5 – CI	0,1	0,36
SensiFast	-	8
DNA	-	3,6

Cf = Concentração final; V = Volume pipetado; *SensiFast™* (Bioline, Germany)

Para cada ensaio realizou-se dois CN, um CI como referido anteriormente e um CP, constituído por DNA extraído de uma cultura de uma estirpe de referência de *N. gonorrhoeae* (ATCC® 3857).

A reação de amplificação foi executada no termociclador *Rotor-Gene 3000* (Corbett Robotics, Austrália) com o seguinte perfil de reação: aquecimento a 95°C

durante 10 minutos seguido de 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos e 60°C durante 60 segundos.

Os resultados da amplificação foram visualizados em dois gráficos distintos correspondendo ao sinal de cada sonda em cada canal (FAM e Cy5). A presença ou ausência da amplificação do pseudogene *porA* foi visualizada no canal FAM e a ausência ou presença de inibidores de amplificação visualizada no canal Cy5.

Uma amostra foi considerada positiva para pesquisa de DNA de *N. gonorrhoeae* quando observada uma curva de amplificação no canal FAM. Todas as amostras positivas foram confirmadas por outra técnica de PCR para pesquisa de DNA de *N. gonorrhoeae*.

Uma amostra foi considerada negativa para pesquisa de DNA de *N. gonorrhoeae* quando não se observou sinal de amplificação no canal FAM associado à curva de amplificação do CI, no canal Cy5.

2.8.2 Amplificação de Uma Sequência do Gene *ccpB*

A técnica de PCR a utilizar baseou-se na descrita por Ho *et al.* (1991) (104). Esta utilizou como alvo de amplificação uma sequência do gene *ccpB* com 641 pb do plasmídeo críptico de *N. gonorrhoeae* (pJD1), sendo o produto de amplificação de 390 pb.

Os *primers* utilizados foram comercializados pela ThermoFisher Scientific, USA e encontram-se descritas na tabela 11.

Tabela 11 – *Primers* utilizados na técnica de PCR para detecção do gene *ccpB* de *N. gonorrhoeae*

Gene Alvo	Primers e respectiva Sequência	Tamanho do Produto de PCR Amplificado
<i>ccpB</i>	HO1 - 5' - GCT ACG CAT ACC CGC GTT GC -3' HO3 -5' - CGA AGA CCT TCG AGC AGA CA - 3'	390 pb

Em cada ensaio de amplificação efetuado utilizou-se os controlos (CN e CP) usados na técnica anteriormente descrita (2.8.1).

As condições de reação (para um volume final de 25µl) realizadas num compartimento físico em câmara de luxo laminar (NuAire, USA), encontram-se esquematizados na tabela 12.

Tabela 12 - Condições de PCR para a amplificação de uma sequência do gene *ccpB* de *N. gonorrhoeae*

Reagentes	Cf	V (µl)
Água milli-Q	-	37
10X Tampão (BioTaq NH ₄)	1X	2,5
dNTPs	16µM	2
50mM MgCl ₂	2mM	1
Primer HO1	0,5µM	1
Primer HO3	0,5 µM	1
Taq DNA pol	0,04 U	0,2
DNA	-	12,3

Cf= Concentração final; V= Volume pipetado; Primers (Invitrogen™, USA); *Taq* DNA polymerase (*BIOTAQ™ DNA polymerase*, Bioline, UK); 10X PCR Tampão -Tampão de reação (Bioline, UK); MgCl₂ - cloreto de magnésio (Bioline) dNTPs - Desoxirribonucleótidos (Amersham Pharmacia Biotech, Ge Helthcare, EUA)

A amplificação foi efetuada no termociclador *Master Cycle Personal* (Eppendorf, USA), com as seguintes condições: ciclo inicial a 94°C durante 30 segundos, seguido de 40 ciclos de 59°C a 1 minuto e 74°C durante 30 segundos.

Posteriormente à obtenção do produto amplificado, procedeu-se a sua visualização. Esta foi efetuada após separação do mesmo por electroforese em gel de agarose a 1,5% (*Agarose Molecular Grade*, Bioline) com uma concentração de brometo de etídeo 0,5µg/mL (Fluka® Analytical), em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 0,5X (National Diagnostics, USA). O tamanho dos fragmentos amplificados foi identificado por comparação com o padrão de migração do marcador de peso molecular, *HyperLadder IV* (Bioline, UK).

Para a electroforese utilizou-se 5µl de produto amplificado misturado com 2µl de uma solução saturada de sacarose corada com azul de bromofenol (Fermentas, UK), tendo o gel sido submetido a uma fonte de corrente elétrica (*Power Pac 300*, BioRad, USA) de 100V e 50A durante 60 minutos (BioRad Power Pac™ Basic), em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 0,5X numa tina de electroforese (*BioRad Sub-Cell® GT*, Hemel Hempstead, UK). A visualização dos produtos de amplificação foi observada como descrito anteriormente (2.7.3)

Uma amostra foi considerada positiva para *Neisseria spp.* quando se visualizou uma banda correspondente a um fragmento de 390 pb.

2.8.2.1 Digestão enzimática – RFLP

A técnica de RFPL consistiu na digestão do produto amplificado pela técnica anterior, utilizando a enzima de restrição *MspI*. A confirmação de DNA de *N. gonorrhoeae* é efetuada pela produção de dois fragmentos, um com 250 pb e outro com 140 pb.

As condições de digestão (para um volume final de 20µl) encontram-se esquematizados na tabela 13, sendo a mistura realizada num compartimento físico em câmara de luxo laminar (NuAire, USA).

Tabela 13 - Condições de digestão do produto de PCR com a enzima de restrição *MspI*

Reagentes	Cf	V (µl)
Água milli-Q	-	16
10X Tampão de enzima	1X	2
Enzima de Restrição	5U	2
Produto PCR	-	10

Cf= Concentração final; V= Volume pipetado; Enzima de restrição e respetivo tampão (Fermentas®)

Esta mistura foi incubada a 37°C em banho-maria, durante a noite. Os produtos da digestão foram analisados após electroforese em gel de agarose a 2% (*Agarose Molecular Grade*, Bioline) com uma concentração de brometo de etídeo 0,5µg/mL (Fluka® Analytical) em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 0,5X (National Diagnostics, USA). O tamanho dos fragmentos amplificados foi identificado por comparação com o padrão de migração do marcador de peso molecular *HyperLadder V* (Bioline, UK). Para a electroforese utilizou-se 10µl da mistura de digestão com 2µl de uma solução saturada de sacarose corada com azul de bromofenol (Fermentas, UK). Para a visualização dos produtos resultantes procedeu-se de igual forma à descrita anteriormente (2.7.3).

As amostras foram consideradas positivas para pesquisa de DNA de *N. gonorrhoeae* quando se observavam duas bandas, uma de 140 pb e outra de 250 pb.

2.9 Pesquisa e Quantificação de Anticorpos anti-*T. pallidum*

A pesquisa de anticorpos anti-*T. pallidum* por testes serológicos foi efetuada em todas as amostras de soro/plasma, tendo-se executado um teste Não-Treponémico: Rapid Plasm Reagin (RPR) e um Treponémico: *T. pallidum* Hemagglutination Assay (TPHA).

2.9.1 Testes Não Treponémico – RPR

O teste de RPR utilizado neste estudo foi o teste comercializado *Macro-Vue*™ *RPR Card Test*, que permitiu uma leitura macroscópica da reação. O teste foi executado seguindo-se o protocolo estabelecido pela casa comercial quer na avaliação qualitativa quer na quantitativa.

Este teste utiliza uma suspensão antigénica estabilizada de partículas de carvão constituída por cardiolipina, que quando colocada em contacto com soro/plasma de indivíduos infetados por *T. pallidum* ocorre reação. A reação é considerada positiva quando visualizada floculação e negativa na ausência da mesma (avaliação qualitativa). Esta reação pode ser titulada (avaliação quantitativa), sendo considerado como título a última diluição em que se observou reatividade.

2.9.2 Testes Treponémico – TPHA

O teste TPHA utilizado neste trabalho foi o teste comercializado *TPHA 200 de Lab 21 Healthcare Ltd.*. As amostras foram analisadas qualitativamente por este teste, segundo as instruções da casa comercial.

Este teste utiliza eritrócitos de aves revestidos com antígenos de *T. pallidum*, estirpe de Nichols que, quando colocados em contacto com o anticorpo específico induz hemaglutinação das células observando-se um “véu” considerado como teste reativo. Quando a amostra não contém os anticorpos específicos, não ocorre hemaglutinação e observa-se deposição das células em botão ou em pequeno anel. Para o controlo da especificidade da reação utilizou-se uma suspensão de eritrócitos não sensibilizados.

2.10 Pesquisa de anticorpos para o vírus da hepatite C

Para a pesquisa de anticorpos anti-VHC usou-se um kit de deteção rápida comercial da *Info*® *In Vitro Diagnostic*, seguindo-se as instruções do mesmo.

O kit consiste num ensaio imunocromatográfico qualitativo que utiliza uma membrana de nitrocelulose onde foram imobilizados antígenos recombinantes de VHC conjugados com ouro coloidal sobre a área do teste. Quando a amostra clínica contém anticorpos anti-VHC estes ligam-se aos antígenos da membrana e obtém-se um sinal de cor visível (teste reativo). Como controlo do procedimento, deve aparecer sempre uma linha corada na zona do controlo.

2.11 Pesquisa de antígenos de superfície do vírus da hepatite B (AgHBs)

Para a pesquisa de AgHBs usou-se um kit comercial de deteção rápida, *Info® In Vitro Diagnostic*, seguindo-se as instruções do mesmo.

Este teste comercial é um ensaio imunocromatográfico qualitativo semelhante ao teste anterior de pesquisa de anticorpos anti-VHC que apresenta imobilizados na membrana de nitrocelulose anticorpos monoclonais anti-AgHbs conjugados com ouro coloidal. Quando a amostra clínica contém AgHBs estes ligam-se aos anticorpos monoclonais presentes na membrana e obtém-se um sinal de cor visível, sendo o resultado considerado como teste reativo. Como controlo do procedimento, deve aparecer sempre uma linha corada na zona do controlo.

2.12 Pesquisa de anticorpos para o vírus da imunodeficiência humana (VIH) Tipo 1/2

A pesquisa de anticorpos para o VIH-1 e VIH-2 bem como do antígeno p24 do VIH-1 foi efetuada com base no teste comercial de deteção rápida de 4ª geração *Alere Determine™ HIV-1/2 Ag/Ab Combo*, seguindo-se as instruções do mesmo.

Este é também um teste imunocromatográfico qualitativo para a deteção simultânea do antígeno p24 não imunocomplexado e de anticorpos VIH-1 e VIH-2. Apresenta uma membrana de nitrocelulose com uma mistura de anticorpo anti-p24 biotinilado, um composto químico selénio coloidal-antígeno e um anticorpo anti-p24 conjugado com selénio coloidal.

Se os anticorpos do VIH-1 e/ou VIH-2 estiverem presentes na amostra os anticorpos ligam-se aos antígenos recombinantes imobilizados e péptidos sintéticos na membrana formando um sinal de cor visível (teste reativo). Por outro lado, se o

antigénio p24 do VIH-1 estiver presente na amostra, o antigénio liga-se ao anti-p24 biotinilado e ao anticorpo anti-p24 coloide e a uma avidina imobilizada, formando um sinal de cor visível (teste reativo). Para controlo do procedimento, deve aparecer sempre uma linha corada na zona do controlo.

3. RESULTADOS

3.1 Caracterização Sociodemográfica da População em Estudo

No presente estudo foram incluídos 647 indivíduos dos quais 538/647 (83,2%) dizem respeito à UMR (Unidade Móvel de Rastreio) e 109/647 (16,8%) ao CAOMIO (Centro de Acolhimento e Orientação à Mulher das Irmãs Oblatas).

A distribuição do número de participantes entre o género foi a seguinte: 361/647 (55,8%) pertenceram ao sexo masculino e 286/647 (44,2%) ao sexo feminino. A sua distribuição pelos dois grupos estudados encontra-se descrita na tabela 14.

Tabela 14 - Caraterização da população de acordo com o género

População	Nº Indivíduos	Género	
		♂	♀
UMR	538	331	207
CAOMIO	109	30	79
Total	647	361	286

Legenda: ♂ - género masculino; ♀ - género feminino; UMR - Unidade Móvel de Rastreios; CAOMIO - Centro de Acolhimento e Orientação à Mulher das Irmãs Oblatas

A amostra total foi composta por 371 amostras de urina, 241 exsudados vaginais, 5 exsudados uretrais e 594 amostras de soro/plasma.

Em relação à idade responderam 639/647 (98,8%) participantes, apresentando idades compreendidas entre 17 e 87 anos. A média das idades foi de 40,9 e a mediana de 40, com um desvio padrão de 14,7, sendo a moda os 34 anos. Particularizando para cada género, a mediana de idades do sexo masculino correspondeu a 42,0 e a do sexo feminino 37,5. Através da aplicação do teste de Mann-Whitney-Wilcoxon foram observadas diferenças estatisticamente significativas para a idade segundo o género ($p < 0,001$). As medidas de tendência central (média, mediana) e de dispersão (desvio padrão, máximos e mínimos) para esta relação, encontram-se na tabela 15.

Tabela 15 - Estatística descritiva da variável idade segundo o género e comparação das medianas através do teste de Mann-Whitney-Wilcoxon

Género	N	Média	Mediana	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	<i>p-value</i>
♂	353	42,9	42,0	15,1	17	82	0,000
♀	286	38,6	37,5	13,8	18	87	
Global	639	40,9	40,0	14,7	17	87	

Legenda: ♂ - género masculino; ♀ - género feminino; valor de *p* para $\alpha=0,05$, obtido pelo teste de Mann-Whitney-Wilcoxon

Os dados apurados em relação à idade foram posteriormente agrupados em cinco grupos etários, 15-19, 20-24, 25-34, 35-44, ≥ 45 de acordo com os dados reportados pelo Centro Europeu de Prevenção e Controlo das Doenças (ECDC do inglês *European Centre for Disease Prevention and Control*), descritos na figura 3 (46). A faixa etária correspondente à maioria dos inquiridos foi a superior a 45 anos, seguida da [25-34], [35-44], [20-24] e por fim [15-19], com 252/639 (39,4%), 158/639 (24,7%), 138/639 (21,6%), 73/639 (11,4%) e 18/639 (2,8%), indivíduos respetivamente.

Para ambos os géneros o comportamento em relação à idade agrupada foi o mesmo da população geral.

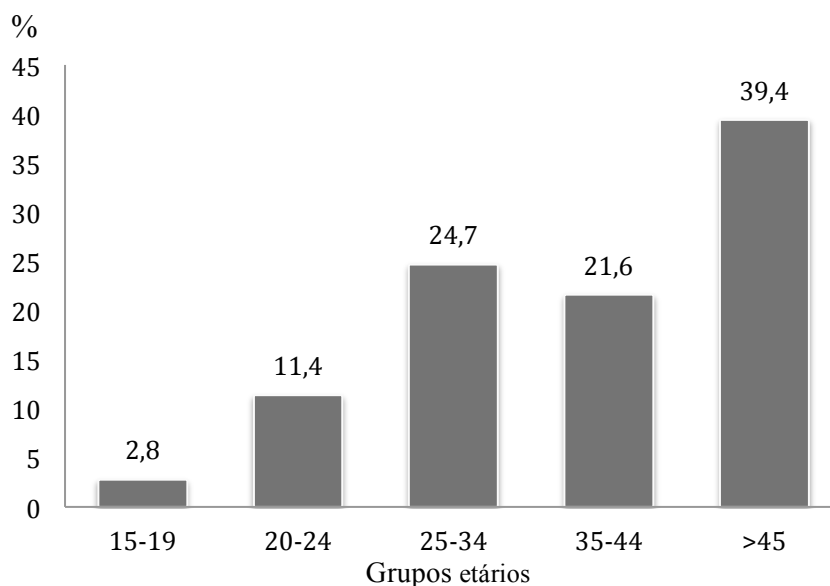


Figura 3 - Distribuição da população por grupos etários, em frequência relativa

A distribuição dos participantes pelos diferentes níveis de escolaridade e respetivas frequências encontram-se descritas na tabela 16. O nível correspondente ao primeiro ciclo registou um maior número de participantes, 271/620 (43,7%), seguindo-se 204/620 (32,9%) com o terceiro ciclo, 95/620 (15,3%) com uma licenciatura, 24/620

(3,9%) com o ensino secundário, 2/620 (0,3%) com o segundo ciclo e com mestrado, respetivamente e 1/620 (0,2%) com o doutoramento. 22/620 (3,5%) participantes não referiram nenhum grau de ensino. Os dados correspondentes a esta variável foram relatados por 620/647 (95,8%) indivíduos. Para ambos os géneros, a maioria dos participantes correspondeu a indivíduos com um nível básico de escolaridade.

Tabela 16 – Distribuição da população de acordo com os níveis de escolaridade

Nível de Escolaridade		Frequência Absoluta n=620	Frequência Relativa (%)
Ensino básico	1º Ciclo	271	43,7%
	2º Ciclo	2	0,3%
	3º Ciclo	204	32,9%
Ensino secundário		24	3,9%
Ensino superior	Licenciatura	95	15,3%
	Mestrado	1	0,2%
	Doutoramento	1	0,2%
Sem grau de ensino		22	3,5%

Em 642/647 (99,2%) indivíduos foi possível identificar a sua origem geográfica: Portugal 302/642 (47,0%), Países Africanos de Língua Oficial Portuguesa (PALOP) 222/642 (34,6%), América do Sul 57/642 (8,9%), África Ocidental e Europa de Leste 20/642 (3,1%), Ásia 9/642 (1,4%), Europa Ocidental 8/642 (1,2%) e América Central 4/642 (0,6%).

Avaliando a distribuição da amostra reagrupada numa nova variável *portuguesa vs não portuguesa*, obtiveram-se 302/642 (47,0%) com nacionalidade portuguesa e 340/642 (53,0%) com nacionalidade não portuguesa.

No que se refere à orientação sexual, 620/647 (95,8%) participantes responderam a este parâmetro. A maioria, 576/620 (92,9%) disse ser heterossexual, seguida de 26/620 (4,2%) que afirmaram ser homossexuais, sendo que destes 19/26 (73,1%) são homens que fazem sexo com homens (HSH) e 18/620 (2,9%) bissexuais (Figura 4). Não foram apresentadas diferenças estatisticamente significativas, pelo teste do Qui-Quadrado, em relação a esta variável e ao género dos indivíduos em estudo.

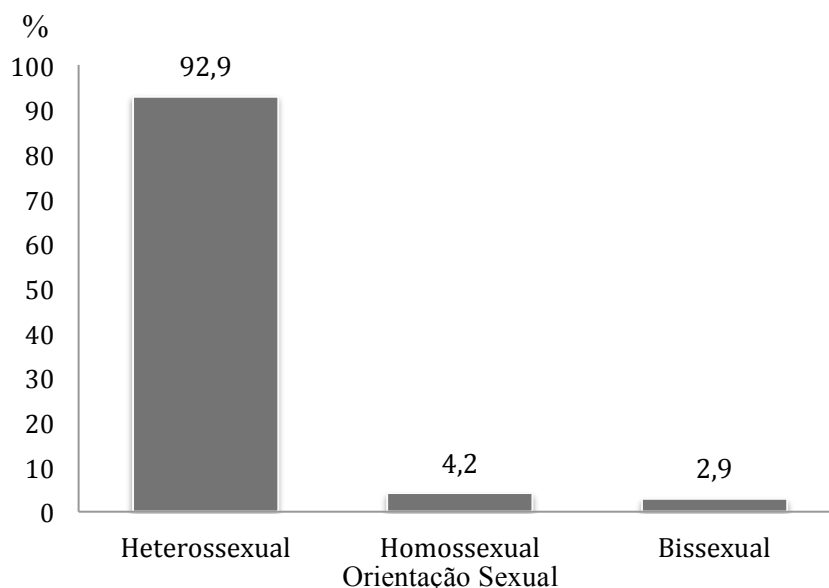


Figura 4 – Distribuição da população em relação à orientação sexual, em frequência relativa

Relativamente ao estado civil responderam 623/647 (96,3%) dos participantes envolvidos no estudo, dos quais 356/623 (57,1%) afirmaram ser solteiros, 187/623 (30,0%) eram casados ou estavam em união de facto, 65/623 (10,4%) divorciados e 15/623 (2,4%) viúvos.

No que diz respeito à situação profissional obtiveram-se 592/647 (91,5%) respostas (335 do sexo masculino e 257 do feminino), sendo que 269/592 (45,4%) encontravam-se desempregados e destes 173/335 (51,6%) eram do sexo masculino e 96/257 (37,4%) do feminino. Os indivíduos empregados representaram 171/592 (28,9%), dos quais 85/335 (25,4%) corresponderam a indivíduos do sexo masculino e 86/257 (33,5%) do feminino, 63/592 (10,6%) estavam reformados e destes, 45/335 (13,4%) pertenceram ao sexo masculino e 18/257 (7,0%) ao feminino. Os indivíduos que afirmaram ser estudantes eram 58/592 (9,8%), dos quais 30/335 (9,0%) eram do sexo masculino e 28/257 (10,9%) do sexo feminino, e 31/592 (5,2%) trabalhadores do sexo, em que 29/257 (11,3%) pertenciam ao sexo feminino e apenas 2/335 (0,6%) ao masculino.

Quanto à relação entre a situação profissional e o género, a partir do teste do Qui-Quadrado, foi demonstrada uma associação muito significativa ($p < 0,001$). Porém,

quando retirada a categoria “*trabalhadores do sexo*” esta relação perde o seu significado estatístico.

3.2 Atitudes e Práticas Relativamente à Vida Sexual da População em Estudo

Quando considerada a idade da primeira relação sexual dos participantes envolvidos no estudo, 607/647 (93,8%) citaram idades compreendidas entre 8 e 40 anos. A mediana de idades foi de 16 anos, com um desvio padrão de 3,5, sendo a moda de 17, correspondente a 93/607 (15,3%) indivíduos. Na comparação entre a idade da primeira relação sexual e os géneros verificou-se que, apesar de a média de idade para a primeira relação sexual ser idêntica entre os géneros (16,88 anos para o sexo feminino e 16,42 para o sexo masculino), a mediana foi de 17 anos para o sexo masculino e de 16 para o feminino. Os indivíduos do sexo feminino tendem a iniciar a sua vida sexual mais cedo. Através da aplicação do teste estatístico de Mann-Whitney-Wilcoxon, observam-se diferenças estatisticamente significativas ($p=0,003$).

Em relação ao número de parceiros(as) sexuais nos últimos seis meses, responderam 607/647 (93,8%) participantes (345 do sexo masculino e 262 do sexo feminino). A maioria, 296/607 (48,8%) revelou ter tido apenas um parceiro(a), sendo que 143/607 (23,6%) teve entre 2 e 10 seguindo-se nenhum 114/607 (18,8%), e 54/607 (8,9%) mais de 10 parceiros(as). A mediana foi de 1 parceiro(a) com o desvio padrão de 3,42.

A partir da análise da relação entre o número de parceiros(as) sexuais nos últimos seis meses e a situação profissional, verificou-se que para as variáveis correspondentes às situações profissionais, *estudante*, *empregado*, *desempregado* e *reformado*, a mediana do número de parceiros(as) correspondeu a um(a) parceiro(a), com um máximo de 20 e um mínimo de nenhum parceiro(a) sexual nos seis meses anteriores, e que para a categoria profissional “*trabalhadores do sexo*” a mediana foi de 20 parceiros(as) com um máximo de 100 e um mínimo de um parceiro(a) nos últimos seis meses. As medidas de tendência central e de dispersão para a idade segundo a situação profissional, encontram-se descritas na tabela 17.

A aplicação do teste de Kruskal-Wallis, revelou diferenças estatisticamente significativas para o número de parceiros(as) nos últimos seis meses e a situação

profissional ($p<0,001$), que perde significado estatístico quando retirada a categoria profissional “*trabalhadores do sexo*”, uma vez que os indivíduos pertencentes a esta categoria apresentam um número médio de parceiros(as) bastante superior ao das outras categorias profissionais.

Tabela 17 – Estatística descritiva da número de parceiros(as) nos últimos seis meses segundo a situação profissional e comparação das medianas através do teste de Kruskal-Wallis

Situação Profissional	n	Mediana	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	<i>p-value</i>
Estudante	57	1,00	2,93	0	20	0,000
Empregado	162	1,00	1,70	0	20	
Desempregado	256	1,00	2,36	0	20	
Reformado	58	1,00	2,88	0	20	
Trabalhadores do sexo	27	20,00	5,25	1	100	

valor de p para $\alpha=0,05$, obtido pelo teste de Kruskal-Wallis

Quando analisada a relação entre o género e o número de parceiros(as) nos últimos seis meses, verificou-se que a maioria das participantes do sexo feminino, 146/262 (55,7%), refere apenas ter tido um parceiro sexual nos últimos seis meses, 38/262 (14,5%) entre 2 e 10 parceiros(as) e 41/262 (15,6%) mais de dez parceiros(as) no mesmo período. Para os participantes do sexo masculino, registou-se também uma maioria de 150/345 (43,5%) indivíduos com apenas um parceiro(a) nos últimos seis meses, sendo observado 105/345 (30,4%) com 2 a 10 parceiros(as) e 13/345 (3,8%) com mais de 10 parceiros(as). Relativamente a não terem tido nenhum parceiro sexual nos últimos seis meses, a percentagem de participantes do sexo masculino que o referiu foi mais elevada do que a das participantes do sexo feminino (22,3% *versus* 14,1%). A comparação segundo o género em relação ao número de parceiros(as) nos últimos seis meses, foi realizada através do teste de Mann-Whitney-Wilcoxon, tendo sido encontradas diferenças estatisticamente significativas ($p<0,001$). Retirando a categoria “*trabalhadores do sexo*” observa-se uma redução significativa nos indivíduos do sexo feminino que referem ter mais de 10 parceiros(as) sexuais nos últimos seis meses (15,6% *versus* 6,4%).

No que diz respeito ao tipo de contacto sexual praticado (vaginal, oral e anal) responderam 629/647 (97,2%) indivíduos, sendo que 338/629 (53,7%), 2/629 (0,3%), 1/629 (0,2%), 126/629 (20,0%), 7/629 (1,1%), 10/629 (1,6%) e 145/629 (23,1%) referiu

praticar contacto sexual vaginal, oral ou anal, tanto vaginal e como oral, vaginal e anal, oral e anal, e vaginal, oral e anal, respetivamente (Tabela 18).

Tabela 18 – Distribuição da população de acordo com o tipo de contacto sexual praticado

Tipo de Contacto Sexual	Frequência Absoluta n=629	Frequência Relativa (%)
Vaginal	338	53,7
Oral	2	0,3
Anal	1	0,2
Vaginal e oral	126	20,0
Vaginal e anal	7	1,1
Oral e anal	10	1,6
Vaginal, oral e anal	145	23,1

Para avaliar a consistência e a frequência da utilização do preservativo, pediu-se aos participantes que assinalassem entre as quatro categorias que a seguir se mencionam: (i) *nunca*, (ii) *sempre exceto com o parceiro*, (iii) *ocasionalmente* e (iv) *sempre*, para cada tipo de relação sexual (vaginal, oral e anal).

A distribuição das respostas obtidas para cada uma das opções, encontra-se na figura 5, para as relações vaginais (619 respostas) sendo que, 123/619 (19,9%), 31/619 (5,0%), 298/619 (48,1%), 167/619 (27,0%), responderam que utilizam *sempre*, *sempre exceto com o parceiro*, *ocasionalmente* e *nunca*, respetivamente; na figura 6, para as relações sexuais orais (282 respostas), 34/282 (12,1%), 6/282 (2,1%), 64/282 (22,7%), 178/282 (63,1%), que disse usar *sempre*, *sempre exceto com o parceiro*, *ocasionalmente* e *nunca*, respetivamente; e na figura 7, para as relações sexuais anais (162 respostas) com a seguinte distribuição, 42/162 (25,9%), 4/162 (2,5%), 55/162 (34,0%), 61/162 (37,7%), que referem usar *sempre*, *sempre exceto com o parceiro*, *ocasionalmente* e *nunca*, respetivamente. As quatro categorias disponíveis para o uso do preservativo foram reagrupadas em duas: “*sempre*” (para os que referiram sempre) e “*às vezes*” (para os que afirmam um uso inconstante do preservativo como é o caso de “*sempre exceto com o parceiro, ocasionalmente ou nunca*”). O número de participantes que referiu usar “*sempre*” o preservativo quando têm relações sexuais vaginais, orais e anais foi 123/619 (19,9%), 34/282 (12,1%) e 42/162 (25,9%), respetivamente, e o número dos que referiram usar “*às vezes*” do preservativo quando têm relações sexuais vaginais, orais e anais foi 496/619 (80,1%), 248/282 (87,9%) e 120/162 (74,1%), respetivamente.

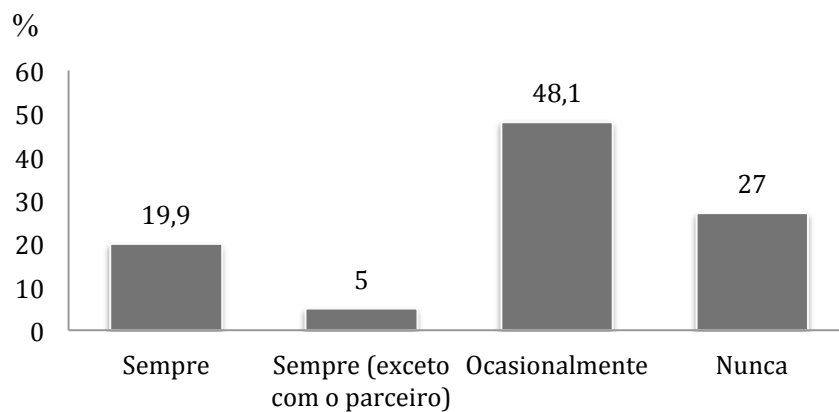


Figura 5 - Distribuição global das respostas obtidas em relação à utilização do preservativo nas relações sexuais vaginais, na escala: *sempre, sempre exceto com o parceiro, ocasionalmente, nunca*

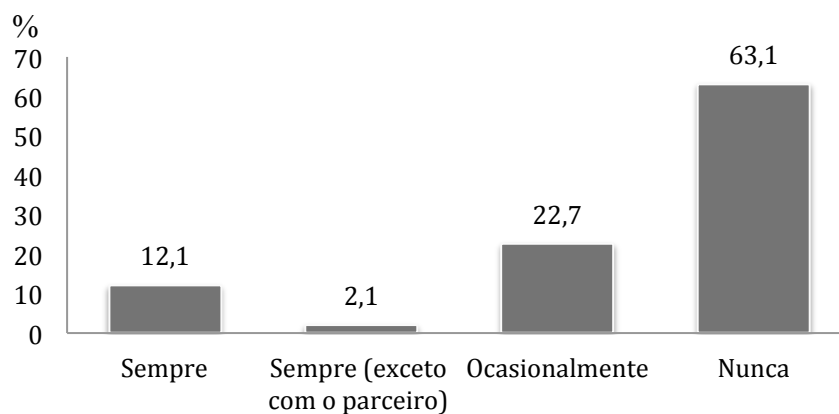


Figura 6 - Distribuição global das respostas obtidas em relação à utilização do preservativo nas relações sexuais orais, na escala: *sempre, sempre exceto com o parceiro, ocasionalmente, nunca*

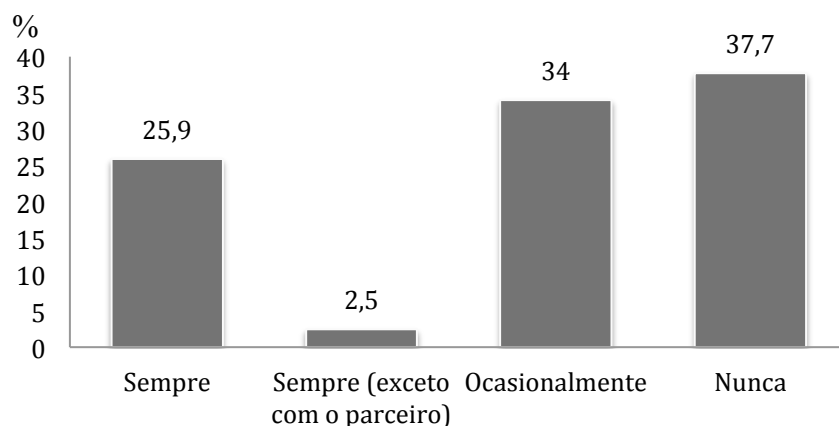


Figura 7 - Distribuição global das respostas obtidas em relação à utilização do preservativo nas relações sexuais anais, na escala: *sempre, sempre exceto com o parceiro, ocasionalmente, nunca*

Avaliando a frequência do uso do preservativo com as duas variáveis reagrupadas, para as diferentes relações sexuais (vaginal, oral e anal) em relação ao género, verificou-se que: para o uso do preservativo nas relações sexuais vaginais responderam 342/619 (55,3%) participantes do sexo masculino, sendo que destes 69/342 (20,2%) e 273/342 (79,8%) afirmaram usar “sempre” e “às vezes” o preservativo, respectivamente, e 277/619 (44,7%) participantes do sexo feminino, afirmando 54/277 (19,5%) e 223/277 (80,5%) utilizar “sempre” e “às vezes” o preservativo, respetivamente; no caso do uso do preservativo nas relações sexuais orais, responderam 151/282 (53,5%) participantes do sexo masculino, 10/151 (6,6%) e 141/151 (93,4%) referindo usar “sempre” e “às vezes” o preservativo, respetivamente, ao passo que de 131/282 (46,5%) participantes do sexo feminino, 24/131 (18,3%) e 107/131 (81,7%) revelaram usar “sempre” e “às vezes” o preservativo, respetivamente. No que diz respeito ao uso do preservativo nas relações sexuais anais responderam 106/162 (65,4%) participantes do sexo masculino, 27/106 (25,5%) e 79/106 (74,5%) afirmaram usar “sempre” e “às vezes” o preservativo, respetivamente, enquanto que 56/106 (52,8%) indivíduos do sexo feminino 15/56 (26,8%) e 41/56 (73,2%) declararam usar “sempre” e “às vezes” o preservativo, respetivamente (Tabela 19).

Pelo teste do Qui-Quadrado a diferença foi apenas estatisticamente significativa ($p=0,003$) no caso do uso do preservativo nas relações sexuais orais, visto que um maior número de indivíduos do sexo feminino relataram usar “sempre” o preservativo neste tipo de relações do que os indivíduos do sexo masculino (18,3% *versus* 6,6%, respetivamente).

Tabela 19 - Utilização do preservativo em cada tipo de contacto sexual praticado em relação ao género

Tipo de relação sexual	Utilização do preservativo	Género		<i>p-value</i>
		♂	♀	
Vaginal (n=619)	Sempre	69/342 (20,2%)	54/277 (19,5%)	0,856
	Às vezes	273/342 (79,8%)	223/277 (80,5%)	
Oral (n=282)	Sempre	10/151 (6,6%)	24/131 (18,3%)	0,003
	Às vezes	141/151 (93,4%)	107/131 (81,7%)	
Anal (n=162)	Sempre	27/106 (25,5%)	15/56 (26,8%)	0,792
	Às vezes	79/106 (74,5%)	41/56 (73,2%)	

Legenda: ♂ - género masculino; ♀ - género feminino; ; valor de p para $\alpha=0,05$, obtido pelo teste do Qui-Quadrado

De forma a perceber se os participantes que referiram ter tido mais parceiros(as) sexuais nos últimos seis meses utilizavam constantemente o preservativo, verificou-se que aqueles que revelavam usar “às vezes” o preservativo em qualquer tipo e relação (vaginal, oral e anal) apresentavam números de parceiros(as) sexuais nos últimos seis meses mais elevados do que os que afirmavam usar “sempre” o preservativo. Estas diferenças observadas foram estatisticamente significativas por aplicação do teste de Mann-Whitney-Wilcoxon para as relações sexuais vaginais e orais ($p<0,001$, $p<0,001$ respetivamente). Para as relações sexuais anais não se observa uma associação estatisticamente significativa entre o número de parceiros sexuais e a utilização de preservativo ($p=0,005$).

À questão sobre o facto de ter tido uma IST (exceto o VIH) nos antecedentes pessoais, obtiveram-se 585/647 (90,4%) respostas, das quais 143/585 (24,4%) responderam afirmativamente, 50/143 (35,0%) revelaram ter tido uma infeção passada por *N. gonorrhoeae* e 26/143 (18,2%) por *T. pallidum*. A infeção por *C. trachomatis* foi referida por 7/143 (4,9%) indivíduos. Contudo, analisando as amostras de soro/plasma colhidas verificou-se que dos 26 indivíduos que mencionaram ter tido sífilis, em 5 (19,2%) o teste do TPHA foi não reativo, enquanto que em 28 indivíduos de uma amostra de 511 (5,5%) pertencentes a indivíduos que referem nunca lhes ter sido diagnosticado esta infeção, o TPHA demonstrou ser reativo.

De salientar que 12/647 (1,9%) indivíduos (7 do sexo masculino e 5 do sexo feminino) referiram diagnóstico prévio de infeção pelo VIH.

Quando avaliada a relação entre os géneros e o facto de ter tido uma IST, verificou-se pelo teste do Qui-Quadrado uma associação muito significativa ($p<0,001$), tendo o sexo masculino registado um maior número de IST do que o feminino (31,8% e 18,2% respetivamente).

Em relação à sintomatologia, 44/647 (6,8%) indivíduos referiram apresentar sinais ou sintomas característicos de uma IST. O corrimento vaginal foi mais frequentemente citado no sexo feminino e a presença de úlceras genitais ou corrimento acompanhado de disúria e prurido no masculino.

3.3 Resultados Laboratoriais

As amostras de urina e/ou exsudados para identificação de DNA de *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* por técnicas de amplificação de ácidos nucleicos foram obtidas em 596/647 (92,1%) indivíduos incluídos no presente estudo, 340/596 (57,0%) do sexo masculino e 256/596 (43,0%) do feminino. Amostras de soro/plasma foram colhidas em 594/647 (91,8%) indivíduos para a realização de testes para pesquisa de antígenos e quantificação de anticorpos anti-*T. pallidum*, pesquisa de anticorpos anti-VHC, pesquisa de antígenos de superfície do vírus da hepatite B (AgHBs) e pesquisa de anticorpos anti-VIH.

3.3.1 Resultados Serológicos

Em relação aos resultados serológicos verificou-se que 16/594 (2,7%) indivíduos foram considerados como tendo sífilis latente, dos quais 9/334 (2,7%) pertenceram ao sexo masculino e 7/260 (2,7%) ao feminino; 30/594 (5,1%) apresentou anticorpos anti-VHC e destes 20/334 (6,0%) e 10/260 (3,8%) pertenceram ao sexo masculino e feminino, respectivamente. Foram identificados em 24/594 (4,0%) indivíduos AgHBs, verificando-se que 15/334 (4,5%) pertenciam ao sexo masculino e 9/260 (3,5%) ao feminino. Foi ainda demonstrado a existência da anticorpos anti-VIH em 2/260 (0,8%) indivíduos do sexo feminino.

Aplicando o teste do Qui-Quadrado entre a variável auxiliar “reativo vs não reativo” para cada um dos testes rápidos e a variável gênero, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas (Tabela 20).

Tabela 20 - Resultados serológicos de acordo com o gênero

Tipo de Teste	Frequência Absoluta (n=594)	Frequência Relativa (%)	Gênero		P-value
			♂ (n=334)	♀ (n=260)	
Ac anti- <i>T. pallidum</i> ^{a)}	16	2,7	9 (2,7%)	7 (2,7%)	0,999
Ac anti-VHC	30	5,1	20 (6,0%)	10 (3,8%)	0,237
AgHBs	24	4,0	15 (4,5%)	9 (3,5%)	0,527
Ac anti-VIH ^{b)}	2	0,3	-	2 (0,8%)	0,999

Legenda: ♂ - gênero masculino; ♀ - gênero feminino; Ac – anticorpo; AgHBs – antígeno de superfície do vírus da hepatite B; VIH – vírus da imunodeficiência humana; VHC – vírus da hepatite C; valor de *p* para $\alpha=0,05$, obtido pelo teste do Qui-Quadrado

a) Resultados obtidos a partir da combinação de testes RPR+TPHA reativos

b) Um indivíduo não quis efetuar este teste

3.3.2 Pesquisa de DNA de *C. trachomatis*

A presença de DNA de *C. trachomatis* a partir da técnica de MTR-PCR foi detetada em 19/596 (3,2%) indivíduos, existindo 5/596 (0,8%) resultados indeterminados (amplificação apenas no do canal JOE) (Tabela 21). Estas foram estudadas por outra técnica de detecção de DNA de *C. trachomatis* (*Nested-PCR*) sendo que este foi detetado em apenas uma.

Tabela 21 - Resultados da pesquisa de DNA de *C. trachomatis*

Identificação de <i>C. trachomatis</i> pelas NAAT utilizadas		<i>Nested-PCR</i>	
		Positivo	Negativo
MTR-PCR	Positivo	19	0
	Negativo	1	596
Total		20	596

Legenda: MTR-PCR - Reação em Cadeia da Polimerase Multiplex em Tempo Real, do inglês *Multiplex Real-Time Polymerase Chain Reaction*

Assim sendo, foi detetada presença de DNA de *C. trachomatis* em 20/596 indivíduos, o que se traduz numa frequência de infecção (FI) de 3,4% (IC 95%: 0,022;0,051).

3.3.2.1 Genotipagem

As 20 amostras em que foi identificado DNA de *C. trachomatis* foram submetidas à técnica TR-PCR para identificação do serotipo L (LGV). A presença de DNA deste microrganismo foi detetada numa urina correspondente a um indivíduo do sexo masculino.

Todas as amostras positivas para presença de DNA de *C. trachomatis* foram estudadas por uma técnica de *Nested-PCR* para identificação do genótipo por sequenciação. A amplificação só foi possível em 19 destas amostras.

A amplificação de uma das amostras positivas pela técnica de *Nested-PCR* é apresentada na figura 8.

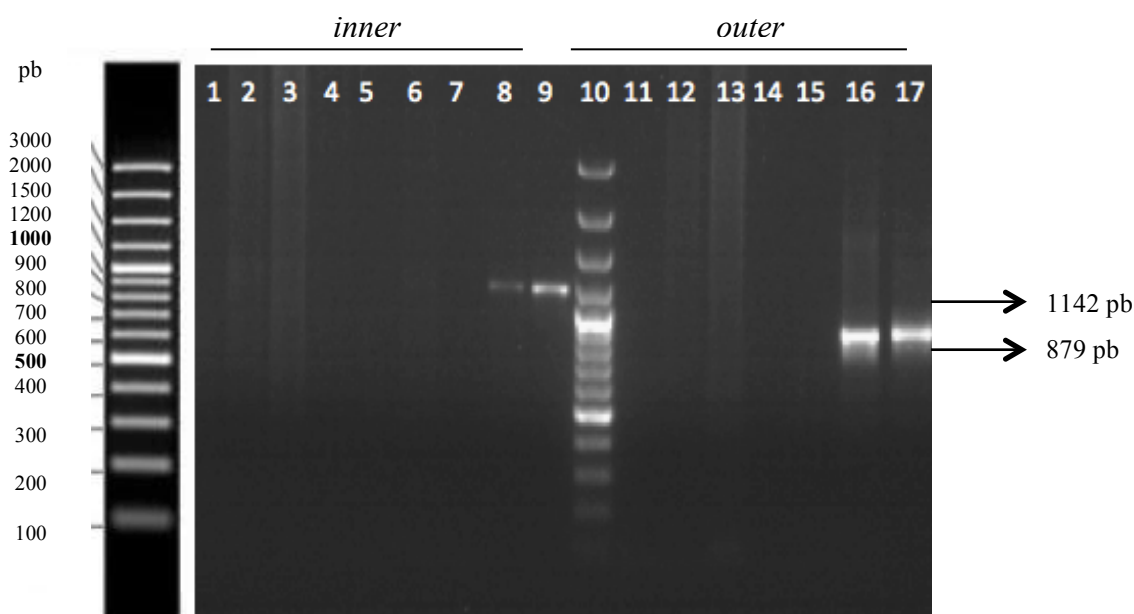


Figura 8 - Resultado da amplificação pela técnica de *Nested-PCR*, após eletroforese em gel de agarose a 1,5%, em tampão TAE 0,5X, com brometo de etídio (0,5µg/ml)

Legenda: 10 – marcador de pesos moleculares 100 pb plus; 8 – produto amplificado na reação *outer*; 1 – controle negativo da reação de *outer*; 9 – controle positivo da reação *outer*; 16 – produtos amplificados na reação de *inner*; 11 – controle negativo da reação de *inner*; 17 – controle positivo da reação de *inner*.

No presente estudo foram identificados seis genótipos de *C. trachomatis* diferentes, D, E, F, G, Ia e L2. O genótipo E foi o mais prevalente, estando presente em 7/19 (36,8%) amostras, seguido do genótipo G em 4/19 (21,1%), D e F em 3/19 (15,8%) e Ia e L2 em 1/19 (5,3%) amostras, respetivamente (Figura 9).

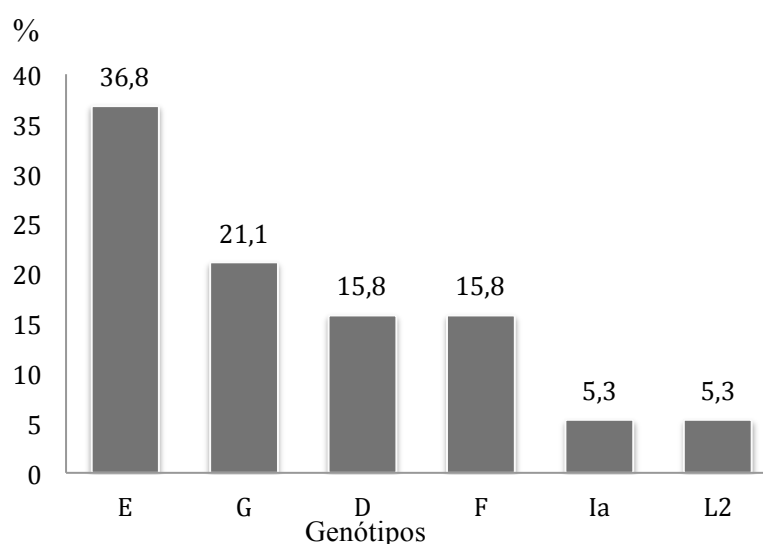


Figura 9 - Distribuição dos genótipos de *C. trachomatis*, em frequência relativa

3.3.3 Pesquisa de DNA de *N. gonorrhoeae*

A identificação de DNA de *N. gonorrhoeae* por técnica de MTR-PCR foi positiva em 6/596 amostras, tendo sido confirmadas pela técnica de RFLP. A frequência da infecção (FI) de *N. gonorrhoeae* na população em estudo foi de 1,0% (IC 95%: 0,005; 0,022).

3.4 Pesquisa de Associações entre as Infecções por *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* e as Variáveis Sociodemográficas e Clínicas

Para avaliar se a infecção era independente da sintomatologia cruzaram-se as variáveis “*apresenta sintomas vs não apresenta sintomas*” com “*população que apresenta infecção por C. trachomatis e/ou N. gonorrhoeae*”, sendo que dos indivíduos infectados por *C. trachomatis*, 2/20 (10,0%) apresentaram sintomas (um do sexo masculino e um do feminino), enquanto que 18/20 (90,0%) foram assintomáticos (11 do sexo masculino e 7 do feminino). Na infecção por *N. gonorrhoeae*, apenas 1/6 (16,7%) indivíduos apresentou sintomas, sendo este do sexo masculino, enquanto que 5/6 (83,3%) foram assintomáticos (4 do sexo masculino e um do feminino). Através da aplicação do teste exacto de Fisher, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas para cada infecção em função de apresentar ou não sintomatologia.

Relativamente à relação entre a infecção por *C. trachomatis* e o género, a presença de DNA deste microrganismo foi detetada em 12/340 (3,5%) indivíduos do sexo masculino e 8/256 (3,1%) do feminino. Pela aplicação do teste do Qui-Quadrado não foram observadas diferenças estatisticamente significativas, entre a infecção por *C. trachomatis* e o género.

A frequência da infecção discriminada pelo género com os respectivos intervalos de confiança (IC 95%) obtidos pelo método de Wilson, encontram-se na tabela 22.

Tabela 22 - Frequência da infecção por *C. trachomatis* por género através de um intervalo de confiança a 95% obtido pelo método de Wilson

Género	FI	[IC 95%]
♂	0,035	[0,002;0,061]
♀	0,031	[0,016;0,06]
Global	0,034	[0,022;0,051]

Legenda: ♂ - género masculino; ♀ - género feminino; FI – Frequência da Infecção; [IC 95%] – Intervalo de confiança a 95%

A distribuição dos genótipos em relação ao género é apresentada na tabela 23, observando-se que para o sexo masculino apenas se conseguiu identificar o genótipo em 11/12 (91,7%) amostras, sendo que destas 3/11 (27,3%) corresponderam ao genótipo E, 2/11 (18,2%) ao G, D e F, respetivamente, e 1/11 (9,1%) ao Ia e o L2 respetivamente. Para o sexo feminino, 4/8 (50,0%) equivaleram ao genótipo E, 2/0 (25,0%) ao G, e por último 1/8 (12,5%) ao D e F, respetivamente. Quando aplicado o teste exacto de Fisher não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os géneros e os genótipos isolados dos indivíduos com infeção por *C. trachomatis*.

Tabela 23 - Genótipos de *C. trachomatis* identificados por género

Genótipo	Género		Total
	♂	♀	
E	3/11 (27,3%)	4/8 (50,0%)	7/19 (36,8%)
G	2/11 (18,2%)	2/8 (25,0%)	4/19 (21,1%)
D	2/11 (18,2%)	1/8 (12,5%)	3/19 (15,8%)
F	2/11 (18,2%)	1/8 (12,5%)	3/19 (15,8%)
Ia	1/11 (9,1%)	0	1/19 (5,3%)
L2	1/11 (9,1%)	0	1/19 (5,3%)
Total	11	8	19

Legenda: ♂ - género masculino; ♀ - género feminino

O mesmo se verificou entre os genótipos e a orientação sexual, observando-se a seguinte distribuição para cada genótipo: o genótipo E foi isolado em 1/7 (14,3%) amostras de indivíduos homossexuais e em 6/7 (85,7%) de indivíduos heterossexuais, o G em 4/4 (100,0%) de indivíduos heterossexuais, o D em 1/3 (33,3%) de indivíduos homossexuais e 2/3 (66,7%) indivíduos heterossexuais, o F em 1/2 (50,0%) indivíduo bissexual e 1/2 (50,0%) num heterossexual, e o Ia e L2 em 1/1 (100,0%) indivíduos heterossexuais, respetivamente.

A infeção por *N. gonorrhoeae* foi detetada em 1/256 (0,4%) indivíduo do sexo feminino e em 5/340 (1,5%) indivíduos do sexo masculino. A frequência da infeção discriminada pelo género com os respetivos intervalos de confiança (IC 95%) obtidos pelo método de Wilson, encontra-se na tabela 24.

Tabela 24 - Frequência da infeção por *N. gonorrhoeae* por género através de um intervalo de confiança de 95% obtido pelo método de Wilson

Género	FI	[IC 95%]
♂	0,015	[0,006;0,034]
♀	0,004	[0,001;0,022]
Global	0,010	[0,005;0,022]

Legenda: ♂ - género masculino; ♀ - género feminino; FI – Frequência da Infeção; [IC 95%] — Intervalo de confiança a 95%

Na análise da relação entre o género e a infeção por *N. gonorrhoeae*, pela aplicação do teste do Qui-Quadrado não foram observadas diferenças estatisticamente significativas.

Para verificar se existiam diferenças entre as medianas de idades da população relativamente ao facto de apresentar ou não infeção por uma das IST bacterianas estudadas, recorreu-se ao agrupamento da seguinte variável: “*sem infeção*” vs “*população que apresenta infeção por um dos dois microrganismos*”.

A mediana de idades da população sem infeção foi de 40,5 anos com um desvio padrão de 14,5, com mínimo nos 17 anos e um máximo nos 87 anos. No que diz respeito à infeção por *C. trachomatis*, a mediana de idades dos indivíduos que apresentava infeção foi de 25,5 anos com um desvio padrão de 9,75, com mínimo nos 18 anos e um máximo nos 40 anos apresentado dois *outliers*, um aos 48 e outro aos 55 anos (Figura 10). Uma associação muito significativa foi demonstrada entre a infeção por *C. trachomatis* e a idade ($p<0,001$), por aplicação do teste estatístico de Mann-Whitney-Wilcoxon.

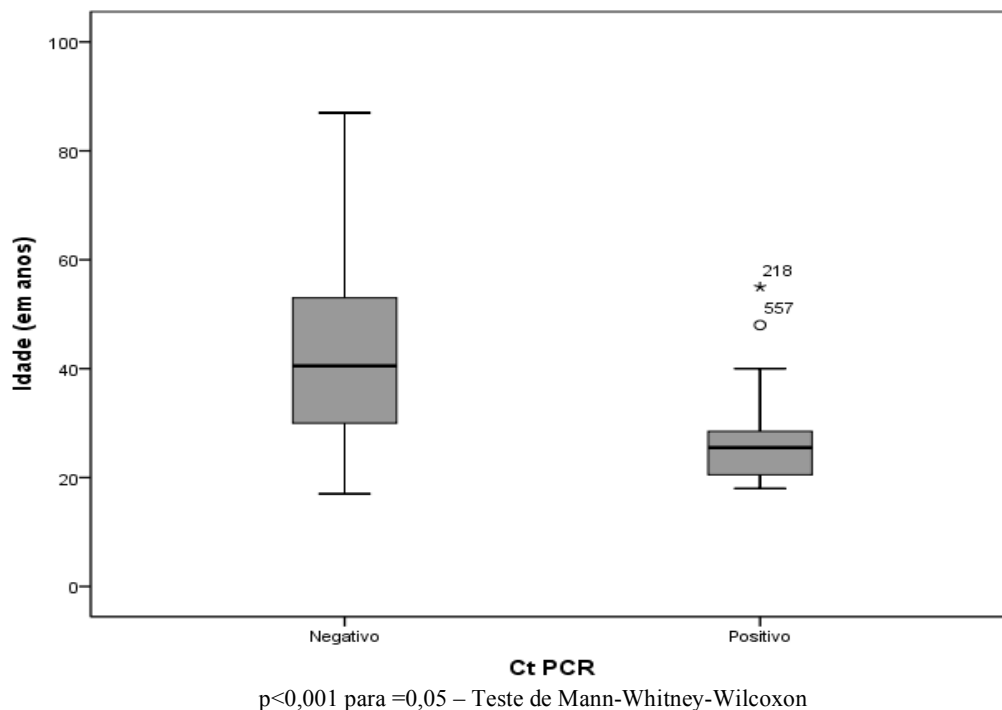


Figura 10 - Relação entre a infecção por *C. trachomatis* e a idade

A mediana de idades dos indivíduos que apresentava esta infecção por *N. gonorrhoeae* foi de 26 anos, apresentando um desvio padrão de 11,91. O mínimo encontrou-se nos 19 anos e o máximo nos 47 anos de idade. Na associação da infecção por *N. gonorrhoeae* com a idade não se observaram diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Mann-Whitney-Wilcoxon.

Reagrupou-se a variável idade nas seguintes categorias *indivíduos com idade <25* vs *indivíduos com idade ≥25*, sendo que dos indivíduos testados para as duas IST bacterianas estudadas 77/588 (13,1%) apresentavam idade inferior a 25 anos e 511/588 (86,9%) idade igual ou superior a 25 anos. Para a infecção por *C. trachomatis*, 9/77 (11,7%) indivíduos infectados apresentaram idade inferior a 25 anos e 11/511 (2,2%) com idade igual ou superior a 25 anos. Em relação à infecção por *N. gonorrhoeae* 1/77 (1,3%) indivíduos infectados por este microrganismo apresentaram idade inferior a 25 anos e 5/511 (1,0%) com idade igual ou superior a 25 anos.

Particularizando para cada género, nota-se que:

- 4/12 (33,3%) dos indivíduos do sexo masculino infectados por *C. trachomatis* apresentavam idade inferior a 25 anos, $p=0,025$;
- 5/8 (62,5%) dos indivíduos do sexo feminino infectados por *C. trachomatis*

apresentavam idade inferior a 25 anos, $p=0,004$;

- Nenhum [0/5 (0%)] dos indivíduos do sexo masculino infectados por *N. gonorrhoeae* apresentava idade inferior a 25 anos, $p=1,000$;
- 1/1 (100,0%) dos indivíduos do sexo feminino infectados por *N. gonorrhoeae* apresentava idade inferior a 25 anos, $p=0,168$;

Por aplicação do teste exacto de Fisher verificou-se uma associação muito significativa entre variável idade e a infeção por *C. trachomatis* ($p<0,001$), o que também se verificou para cada género e infeção por *C. trachomatis* em relação à idade ($p=0,025$ no sexo masculino e $p=0,004$ no feminino). Em relação à infeção por *N. gonorrhoeae* e pelo mesmo teste não foram observadas diferenças estatisticamente significativas.

Quando analisadas as variáveis demográficas como a nacionalidade, o estado civil, a situação profissional e o nível de escolaridade e a sua relação com os indivíduos com infeção por *C. trachomatis*, verificou-se que 8/275 (2,9%) eram de nacionalidade portuguesa, 10/204 (4,9%) dos PALOP e 2/112 (3,8%) de nacionalidade não portuguesa (exceto indivíduos provenientes dos PALOP); 4/239 (1,7%) eram casados ou estavam em união de facto (viviam com o parceiro); e 16/334 (4,8%) não viviam com o parceiro. No que diz respeito à situação profissional 6/190 (3,2%) apresentavam algum tipo de ocupação e 13/356 (3,7%) eram desempregados. A frequência do ensino básico verificou-se em 15/339 (3,4%) e do ensino secundário ou superior em 5/110 (4,5%). No que diz respeito aos indivíduos com infeção por *N. gonorrhoeae*, 4/275 (1,5%) eram de nacionalidade portuguesa e 2/204 (1,0%) provenientes dos PALOP, 3/239 (1,3%) viviam com o parceiro e 3/334 (0,9%) não viviam; 2/190 (1,1%) apresentavam algum tipo de ocupação e 4/356 (1,1%) eram desempregados; 3/439 (0,7%) frequentaram o ensino básico e 3/110 (2,7%) o ensino secundário ou superior.

Por aplicação do teste do Qui-Quadrado para cada uma das variáveis demográficas representadas na tabela 25 e cada uma das IST bacterianas estudadas, apenas foi verificada diferença estatisticamente significativa no cruzamento das variáveis *infeção por C. trachomatis* vs *Estado civil* ($p=0,045$). Para as restantes variáveis analisadas não foram encontradas significâncias estatísticas. No entanto existe uma tendência para associação de todas estas variáveis demográficas com a infeção por *C. trachomatis*.

Tabela 25 – Relação entre as características demográficas da população e a infeção por *C. trachomatis* e por *N. gonorrhoeae*

Variáveis	Categorias	<i>C.</i> <i>trachomatis</i>	<i>P- value</i>	<i>N.</i> <i>gonorrhoeae</i>	<i>P-value</i>
Nacionalidade (n=591)	Portuguesa (n=275)	8 (2,9%)	0,286*	4 (1,5%)	0,587**
	PALOP (n=204)	10 (4,9%)		2 (1,0%)	
	Não-portuguesa (exceto PALOP) (n=112)	2 (1,8%)		-	
Estado Civil (n=573)	Vive com o parceiro (n=239)	4 (1,7%)	0,045*	3 (1,3%)	0,698**
	Não vive com parceiro (n=334)	16 (4,8%)		3 (0,9%)	
Situação Profissional ^{a)} (n=546)	Ocupação profissional (n=190)	6 (3,2%)	0,764*	2 (1,1%)	1,000**
	Sem ocupação (n=356)	13 (3,7%)		4 (1,1%)	
Nível de Escolaridade (n=549)	Ensino básico (n=439)	15 (3,4%)	0,571**	3 (0,7%)	0,098**
	Ensino secundário/superior (n=110)	5 (4,5%)		3 (2,7%)	

Legenda: PALOP – Países de Língua Oficial Portuguesa

^{a)} Um indivíduo infectado por *C. trachomatis* não respondeu a esta categoria

* valor de *p* para $\alpha=0,05$, obtido pelo teste do Qui-Quadrado.

** valor de *p* para $\alpha=0,05$, obtido pelo teste exacto de Fisher

Ao inquirir a população sobre a sua orientação sexual (homossexual, heterossexual e bissexual) e cruzando esta variável com cada uma das infeções, existiram 16/528 (3,0%) indivíduos heterossexuais com infeção por *C. trachomatis*, 2/25 (8,8%) homossexuais e 2/17 (11,8%) bissexuais com infeção por *C. trachomatis*, respetivamente. Dos indivíduos heterossexuais 6/528 (1,1%) estavam infetados por *N. gonorrhoeae*. Quando aplicado o teste exacto de Fisher entre a variável *orientação sexual* e cada uma das infeções não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre estas (Tabela 26).

Tabela 26 - Relação entre a orientação sexual e a infecção por *C. trachomatis* e por *N. gonorrhoeae*

Variáveis	Categorias	<i>C. trachomatis</i>	<i>P- value</i>	<i>N. gonorrhoeae</i>	<i>P-value</i>
Orientação sexual (n=570)	Heterossexual (n=528)	16 (3,0%)	0,059**	6 (1,1%)	1,000**
	Homossexual (n=25)	2 (8,0%) ^{a)}		-	
	Bissexual (n=17)	2 (11,8%) ^{b)}		-	

** valor de *p* para $\alpha=0,05$, obtido pelo teste exacto de Fisher

a) Pertencentes ao sexo feminino

b) Pertencentes ao sexo masculino

Analisando a idade da primeira relação sexual da população que não apresentou nenhuma das IST bacterianas estudadas, observou-se uma mediana de 16 anos com um desvio padrão de 3,5 sendo o mínimo aos 8 anos e o máximo aos 40 anos.

Quando cruzadas as variáveis *infecção por C. trachomatis e/ou N. gonorrhoeae vs idade da primeira relação sexual*, observou-se para ambas as IST bacterianas uma mediana de 17 anos, sendo que os indivíduos infetados por *C. trachomatis* apresentaram um desvio padrão de 2,55 com um mínimo de 12 anos e máximo de 21 anos, enquanto nos indivíduos infectados por *N. gonorrhoeae* o desvio padrão apresentado foi de 2,25 com um mínimo de 12 anos e um máximo de 18 anos. Não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas entre as duas IST bacterianas e a idade da primeira relação sexual a partir do teste de Mann-Whitney-Wilcoxon.

A avaliação entre estas e o número de parceiros(as) nos últimos seis meses recorreu-se ao uso de duas variáveis auxiliares, sendo a primeira “*tem infecção*” vs “*não tem infecção*” e a segunda, “*um parceiro(a)*”, “*2 a 10 parceiros(as)*” e “*mais de 10 parceiros(as)*”. Observou-se que entre os indivíduos que referiram apenas um parceiro sexual nos últimos seis meses, 6/271 (2,2%) estavam infetados por *C. trachomatis*, assim como 12/135 (8,9%) dos que responderam ter tido 2 a 10 parceiros e 2/48 (4,2%) dos que assumiram ter mais de 10 parceiros nos seis meses anteriores. Em relação aos que referiram ter tido apenas um parceiro nos últimos seis meses, 1/271 (0,4%) estava infetado por *N. gonorrhoeae*, assim como 5/135 (3,7%) dos que referiram neste período ter entre 2 a 10 parceiros (Tabela 27).

Tabela 27 - Relação entre o número de parceiros(as) nos últimos seis meses e a infeção por *C. trachomatis* e por *N. gonorrhoeae*

Variáveis	Categorias	<i>C. trachomatis</i>	<i>P-value</i>	<i>N. gonorrhoeae</i>	<i>P-value</i>
Nº parceiros últimos 6 meses (n=562)	1 (n=271)	6 (2,2%)		1 (0,4%)	
	2-10 (n=135)	12 (8,9%)	0,008*	5 (3,7%)	0,029**
	>10 (n=48)	2 (4,2%)		-	

* valor de *p* para $\alpha=0,05$, obtido pelo teste do Qui-Quadrado.

** valor de *p* para $\alpha=0,05$, obtido pelo teste exacto de Fisher

Particularizando para o género masculino, nota-se que:

- 11/12 (91,7%) dos indivíduos infectados por *C. trachomatis* não apresentou parceiro fixo, $p<0,001$;
- 4/5 (80,0%) dos indivíduos infectados por *N. gonorrhoeae* não apresentou parceiro fixo, $p=0,048$;

Nos indivíduos do sexo feminino, observando-se:

- 3/8 (37,5%) dos indivíduos infetados por *C. trachomatis* não tinha parceiro fixo, $p=0,702$;
- 1/1 (100,0%) dos indivíduos infetados por *N. gonorrhoeae* não tinha parceiro fixo, $p=0,304$;

Foram observadas diferenças estatisticamente significativas relativamente ao número de parceiros(as) sexuais nos últimos seis meses para a infeção por *C. trachomatis* ($p=0,008$) e para a infeção por *N. gonorrhoeae* ($p=0,029$), respetivamente pelo testes do Qui-Quadrado e o teste exacto de Fisher.

A análise da relação entre a infeção por *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* e o tipo de contacto sexual praticado, foi efetuada reagrupando a variável “*que tipo de contacto sexual pratica*” em duas categorias: (i) *participantes que apenas referiram praticar sexo vaginal* e (ii) *participantes que referiram praticar sexo vaginal, oral e/ou anal*. Em relação aos indivíduos que apresentaram a infeção por *C. trachomatis*:

- 5/20 (25,0%) referiram apenas contacto sexual vaginal;

- 15/20 (75,0%) referiram contacto sexual vaginal, oral e anal;

e com infeção por *N. gonorrhoeae*:

- Nenhum [0/6 (0%)] referiu apenas a prática de contacto sexual vaginal;
- 6/6 (100%) referiram a prática de contacto sexual oral, vaginal e anal;

O valor de *p-value* obtido no cruzamento da variável *que tipo de contacto sexual pratica* foi de 0,019 pelo teste do Qui-Quadrado, para a infeção por *C. trachomatis* e o valor de *p-value* obtido para a infeção por *N. gonorrhoeae* pelo teste exacto de Fisher foi de 0,007, o que indica que para ambas as infeções existiram diferenças estatisticamente significativas em relação à infeção e ao tipo de relação sexual praticada.

Quando analisada a relação entre o uso do preservativo na população estudada e a infeção por *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae*, verificou-se para os indivíduos infetados por *C. trachomatis* que 4/110 (3,6%) referiu usar “sempre” o preservativo e 16/459 (3,5%) usar “às vezes” o preservativo. Em relação aos indivíduos infetados por *N. gonorrhoeae* verificou-se que apenas 1/110 (0,9%) refere usar “sempre” o preservativo, enquanto que 5/459 (1,2%) refere apenas usar “às vezes” (Tabela 28).

Tabela 28 - Relação entre o uso do preservativo e a infeção por *C. trachomatis* e por *N. gonorrhoeae*

Variáveis	Categorias	<i>C. trachomatis</i>	<i>P- value</i>	<i>N. gonorrhoeae</i>	<i>P-value</i>
Uso do preservativo (n=569)	Sempre (n=110)	4 (0,7%)	0,049**	1 (0,2%)	0,424**
	Às vezes (n=459)	16 (2,8%)		5 (0,9%)	

** valor de *p* para $\alpha=0,05$, obtido pelo teste exacto de Fisher

A aplicação do teste exacto de Fisher, demonstrou apenas diferença estatisticamente significativa entre a infeção por *C. trachomatis* relativamente à utilização do preservativo ($p=0,049$). No caso da infeção por *N. gonorrhoeae* não se observou diferenças estatisticamente significativas com recurso ao mesmo teste estatístico.

Na questão que se prende com o facto de ter tido ou não uma IST no passado e tal situação poder estar ou não relacionada com uma nova aquisição de uma IST

bacteriana, quando esta variável se cruza com a infecção por *C. trachomatis*, 4/20 (20,0%) dos indivíduos infectados declararam uma IST passada e entre os indivíduos infectados por *N. gonorrhoeae*, 3/6 (50,0%) afirmaram uma infecção passada também por *N. gonorrhoeae*. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas pelo teste do Qui-Quadrado ($p=0,961$), em relação a ter uma IST no passado e infecção por *C. trachomatis*, no entanto foram observadas diferenças estatisticamente significativas pelo teste exacto de Fisher ($p=0,047$) para a infecção por *N. gonorrhoeae*.

3.5 Co-infecções por *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* e outras IST

A co-infecção por ambos os agentes microbianos estudados, *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* foi observada em 3/23 (13,0%) indivíduos infectados (2 do sexo masculino e 1 do feminino). A aplicação do teste exato de Fisher revelou uma relação estatisticamente significativa entre estas infecções duas infecções ($p=0,001$).

A análise da relação entre infecção por *C. trachomatis* ou *N. gonorrhoeae* e outra IST concomitante de entre as analisadas neste estudo teve em conta o número de indivíduos que efetuaram colheitas de amostras de soro/plasma e urina/exsudado correspondente a 543/647 (83,9%), dos quais 18/20 (90,0%) com infecção por *C. trachomatis* e 5/6 (83,3%) com *N. gonorrhoeae*. Apenas 2/20 (10,0%) dos indivíduos com infecção por *C. trachomatis* apresentavam infecção concomitante com VIH e com vírus da hepatite B, não sendo observadas co-infecções com outras IST estudadas, como a hepatite C e a sífilis. Em relação às co-infecções não se verificaram diferenças estatisticamente significativas, pelo teste exacto de Fisher.

3.6 Calculo do Risco Relativo

A partir da razão entre a frequência da infecção quer por *C. trachomatis* quer por *N. gonorrhoeae* e alguns fatores sociodemográficos em estudo foi possível calcular o risco relativo (RR) (Tabela 29).

Tabela 29 - Análises entre a relação de algumas variáveis sociodemográficas selecionadas e a infeção por *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* (intervalo de confiança a 95%)

Variáveis Auxiliares	<i>C. trachomatis</i>		<i>N. gonorrhoeae</i>	
	RR	IC 95%[RR	IC 95%[
Sexo Feminino	0,88]0,37;2,13[0,27]0,03;2,26[
Idade <25	5,39]2,31;12,59[2,7]0,5;14,5[
Não ter parceiro fixo	4,83]1,89;12,37[10,36]1,22;87,99[

Legenda: RR – Risco Relativo; IST – infeção sexualmente transmissível IC 95%[– Intervalo de confiança a 95%

A análise da tabela 29 demonstra que para os indivíduos do sexo feminino houve um risco acrescido de 0,88 na aquisição da infeção por *C. trachomatis* e 0,27 na infeção por *N. gonorrhoeae*. Identicamente, o risco estimado de infeção por *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* foi 5,39 e 2,7 vezes maior, para ambos os géneros que apresentavam uma idade inferior a 25 anos, respetivamente. O facto de não terem parceiro fixo apresentou um risco acrescido de 4,83 para a aquisição de *C. trachomatis* e 10,36 para *N. gonorrhoeae* em ambos os géneros.

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A incidência das Infecções Sexualmente Transmissíveis (IST) aumentou substancialmente nos últimos anos no mundo e consequentemente na Europa (2,4). Este aumento tem sido atribuído a mudanças comportamentais ao nível sexual em conjunto com o aumento da sensibilidade dos testes de diagnóstico e da sua facilidade de execução (2,107).

A principal medida de saúde pública destinada a reduzir a cadeia de transmissão das IST minimizando as suas complicações, prende-se com a sua deteção precoce e tratamento correto, conseguido através de programas de rastreio (46,56,107,124). A identificação e compreensão da natureza das redes sexuais locais pode ajudar a direcionar as intervenções para as comunidades mais suscetíveis (125).

Neste trabalho pretendeu-se caracterizar a infeção por *C. trachomatis* e por *N. gonorrhoeae* numa população considerada mais vulnerável à aquisição de infeções por estes microrganismos: verificar a sua prevalência, a existência de associações entre as infeções anteriormente referidas e parâmetros sociodemográficos e clínicos, bem como a pesquisa de associações entre estas infeções e outras IST.

O presente estudo foi do tipo transversal, sendo importante referir o facto de que os dados relativos às características sociodemográficas da população foram recolhidos através de um questionário anónimo, pelo que existe o risco de alguns dos voluntários responderem de acordo com o que parece mais aceite socialmente. Quanto ao processo de seleção da amostra, este foi do tipo aleatório, contribuindo para uma possível generalização da população alvo (126).

4.1 População

O rastreio para as IST apresenta recomendações diferentes consoante o microrganismo. Para a pesquisa de *C. trachomatis* é preferencialmente recomendado a indivíduos do sexo feminino sexualmente ativos com menos de 25 anos, enquanto que a pesquisa de *N. gonorrhoeae* é recomendada sobretudo à subpopulação restrita de homens que fazem sexo com homens (HSH), independentemente da sua idade (40,56,66). No entanto, existem factores intrínsecos ao rastreio que são comuns a ambas as infeções, nomeadamente no que se relaciona com as populações de risco, como é o

caso dos trabalhadores do sexo, a existência de uma infeção por uma IST no passado e/ou presente, presença de múltiplos parceiros sexuais e o uso inconstante do preservativo (40,56). É imperativo considerar o subgrupo populacional correspondente à faixa etária jovem sexualmente ativa, uma vez que representa a maior proporção da população considerada de elevado risco para aquisição de IST (2,28,127).

No presente estudo as características estudadas dos indivíduos que se voluntariaram para participar foram bastantes diversificadas, apesar de realizado em locais estratégicos de maneira a abranger uma maior população considerada mais suscetível de adquirir IST.

A população do presente estudo consistiu principalmente em indivíduos do sexo masculino (55,8%), sendo esta particularidade verificada em muitos estudos deste género (50–52,128,129). A média de idades foi de 40,9 anos. A mediana dos indivíduos do sexo masculino foi superior à do feminino (42,9 anos *versus* 38,6 anos). Em relação à média de idades, esta foi mais elevada do que na maioria dos estudos que apresentam prevalências das IST bacterianas e sua associação com factores sociodemográficos, nos quais a média de idades foi inferior a 30 anos (53,119,120,130,131). Contudo, um estudo realizado em Portugal na cidade do Porto entre 2007 e 2011 por Pedrosa *et al.* para pesquisa de infeções por *C. trachomatis* a média de idades da população estudada correspondeu a 39 anos (50).

Segundo o CDC (do inglês *Centers for Disease Control and Prevention*) é recomendável efetuar rastreio em indivíduos com menos de 25 anos sexualmente ativos para IST, e nomeadamente do sexo feminino para *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* (56). No presente estudo esta população correspondeu a 18,5% dos participantes. A população foi maioritariamente constituída por indivíduos heterossexuais (92,9%) e no que diz respeito a alguns fatores sociodemográficos estudados, por indivíduos que frequentaram apenas o 1º ciclo do ensino básico (43,7%), de nacionalidade portuguesa (47,0%), solteiros (57,1%) e em situação de desemprego (45,4%). O facto de a maioria ser do sexo masculino e heterossexual é semelhante a outros estudos sobre prevalências de *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* realizados na Europa e em Portugal (50–52,128).

No presente estudo observou-se que 5,2% da população estudada referiu ser trabalhador do sexo, sendo esta maioritariamente do sexo feminino. Esta prevalência é igual à do estudo realizado por Corbeto *et al.* em jovens adultos sexualmente ativos,

maioritariamente do sexo feminino, que se deslocaram a clínicas de saúde sexual em Barcelona (130).

Analisando o motivo pelo qual a população se dirigiu ao rastreio voluntário, a maioria (83,5%) realizou-o por motivos de oportunidade/curiosidade. Apenas 16,5% da população afirmou deslocar-se ao mesmo por envolvimento em comportamentos de risco, preferencialmente relacionados com picadas de agulhas, rutura do preservativo e/ou mudança de parceiro sexual, e 6,8% por apresentarem sintomatologia. O conhecimento sobre os fatores de risco para a aquisição de IST na população torna-se assim questionável. O mesmo padrão foi observado no estudo de Corbeto *et al.*, em que os autores verificaram que 71,2% da população estudada apenas se dirigiu ao rastreio por motivo de rotina (130).

A partir dos resultados obtidos relativamente às variáveis utilizadas para avaliar o comportamento sexual da população em estudo nota-se que em relação à idade em que ocorre a primeira relação sexual o padrão observado é idêntico ao referido num estudo alargado realizado por Mendes *et al.* (2014) sobre o comportamento sexual entre jovens portugueses, em que os autores descrevem que o início da atividade sexual ocorreu entre os 16 e os 20 anos (127). Contudo, ao contrário do presente estudo em que a atividade sexual no sexo feminino ocorre numa idade mais precoce, estes observaram que o sexo feminino tende a iniciar a sua vida sexual um pouco mais tarde (127).

No que diz respeito ao número de parceiros sexuais nos últimos seis meses, observou-se que a maioria dos participantes referiram ter tido apenas um parceiro sexual, existindo similaridade entre os géneros. Observações semelhantes às apuradas por Pedrosa *et al.* (2015) e Clarivet *et al.* (2014), sendo que os autores deste último estudaram dados de centros de rastreio de IST em França em indivíduos assintomáticos com menos de 30 anos, verificando que a maioria da população de ambos os géneros declarou ter tido entre 0 a 2 parceiros, num período de 12 meses (50,120).

No presente estudo, o facto de não ter tido nenhum parceiro sexual nos últimos seis meses foi mais referido pelo sexo masculino, sendo o sexo feminino identificado como dispondo de um número mais elevado de parceiros sexuais, nomeadamente daqueles que relatam mais de 10 parceiros, mesmo sem serem trabalhadores do sexo. No entanto a maioria dos indivíduos pertence a este grupo. No estudo realizado por Hammarstrom *et al.* (2015) numa população sueca cuja faixa etária estudada foi dos 15

aos 24 anos, verificaram também que para ambos os géneros a maioria afirmou não ter ou ter apenas um parceiro sexual nos últimos 12 meses. O sexo feminino foi o que revelou ter um maior número de parceiros sexuais (132).

Em relação aos tipos de contacto sexual praticado, a população referiu a prática de apenas contacto sexual vaginal como a mais frequente (53,7%). O padrão observado é idêntico ao referido no estudo de Rapiso-Jiménez *et al.* realizado, entre 2010 e 2011 em Espanha, numa consulta de IST (128). O estudo realizado em 2011 por Gomes *et al.* cujo objectivo foi medir e descrever determinados comportamentos sexuais nos jovens adultos portugueses, revelou que o tipo de contacto sexual mais praticado foi a combinação de relações vaginais e orais seguido do contacto apenas vaginal (133).

Não foram encontrados estudos em que tivesse sido relatada a frequência de utilização do preservativo numa população com uma média de idades tão elevada como a apresentada neste trabalho (40,9 anos). As publicações que se referem a este assunto são sobretudo realizadas em subgrupos populacionais jovens, como por exemplo, o estudo de Hammarstrom *et al.*, no qual a maioria dos participantes (94,6%) referiu encontros sexuais desprotegidos com um parceiro novo ou desconhecido, não sendo registadas diferenças entre os géneros (132). O estudo de Nuñez-Forero *et al.* (2015) que pretendeu caracterizar a prevalência de IST em indivíduos do sexo feminino sintomáticos na Colômbia, encontrou também uma elevada percentagem do uso inconstante do preservativo entre esta população (71%) (134).

Relativamente ao uso do preservativo no tipo de contacto sexual praticado e à semelhança do que foi observado no presente estudo, Rapiso-Jiménez *et al.* observaram que tanto em relações sexuais vaginais como anais a maioria da população revela um uso inconstante do mesmo (128).

Os estudos realizados por Gomes *et al.* e Muñoz-Silva *et al.* (2009) em que, neste último os autores estudaram os comportamentos sexuais de duas subpopulações universitárias (portuguesa e espanhola), demonstraram que em relação ao género não existem diferenças na utilização do preservativo, sendo que a maioria afirma o seu uso inconstante em qualquer tipo de relação (133,135). O mesmo se verificou no presente estudo e no que diz respeito às relações sexuais vaginais e anais. No entanto, na relação entre a prática de sexo oral e o género existiu uma diferença estatisticamente significativa, uma vez que o sexo feminino relatou um uso mais constante do

preservativo (18,3%) do que o masculino (6,6%).

O estudo realizado por Gomes *et al.* foi verificado que o facto de os indivíduos apresentarem parceiro fixo pode ser um indicador para a diminuição de utilização do uso do preservativo (133). No presente estudo observou-se que a percentagem de participantes que referem usar constantemente o preservativo durante as relações sexuais foi estatisticamente baixa entre os que assumiram ter mais do que um parceiro sexual nos últimos seis meses, pelo que o aumento do número de parceiros sexuais não parece favorecer a utilização do preservativo. Embora esta relação apenas tenha sido estatisticamente significativa para as relações vaginais e orais, existiu uma tendência de associação para as relações sexuais anais.

Na população estudada 24,4% dos indivíduos admitiram ter adquirido uma IST no passado, sendo a infeção por *N. gonorrhoeae* (35,0%) e a sífilis (18,2%) as mais prevalentes, e os indivíduos do sexo masculino os que mais declararam esta situação. Uma situação idêntica foi observada no estudo de Borges da Costa *et al.* realizado em 2009 numa clínica de IST da cidade de Lisboa, embora neste caso a sífilis tivesse sido a infeção mais relatada (51).

Na população estudada existiram frequências bastante elevadas das outras IST analisadas, como foi o caso da sífilis (2,7%), da hepatite C (5,1%), da hepatite B (4,0%) e ainda do vírus da imunodeficiência humana (VIH) (0,3%), para além de que 1,9% da população referiu diagnóstico prévio de VIH. Tais observações podem ser verificadas em estudos do género que também efetuaram pesquisa de outras IST, com exceção da hepatite B e C, que normalmente não são pesquisadas nestes estudos (51,129). No que diz respeito à infeção por *T. pallidum*, 5,5% dos indivíduos desconheciam que tinha tido uma infeção por este microrganismo.

4.2 Infeção por *C. trachomatis*

Na população estudada foi detectada a presença de DNA de *C. trachomatis* a partir da técnica de PCR Multiplex em Tempo Real (MTR-PCR do inglês *Multiplex Real-Time Polymerase Chain Reaction*) em 19 indivíduos, tendo sido observadas cinco amostras com resultado indeterminado, uma vez que se verificou a geração de um sinal muito fraco no canal JOE correspondente à amplificação do gene *omp1* da MOMP. Duas explicações são possíveis: uma quantidade muito reduzida de DNA-alvo

(resultado verdadeiro-positivo fraco) ou auto-hidrólise da sonda (resultado falso-positivo) (22). Esta situação reforça a ideia de que sempre que existirem resultados indeterminados pela técnica de MTR-PCR, estes devem ser sempre confirmado por outra técnica de diagnóstico (22). Estas amostras foram também estudadas pela técnica de *Nested-PCR*, sendo que se verificou presença de DNA de *C. trachomatis* em apenas uma.

A mesma técnica foi utilizada para a genotipagem, tendo o DNA de *C. trachomatis* sido detetado em 19 das 20 amostras. Este resultado pode estar relacionado com uma possível contaminação da mesma durante a processo da colocação de DNA na mistura de reação, ou uma quantidade de DNA demasiado reduzida impossibilitando a sua amplificação (22).

A frequência de infeção por *C. trachomatis* foi de 3,4%, idêntica à encontrada no estudo realizado por Pedrosa *et al.*, sendo neste caso de 4,0% (50). Neste, a população estudada foi muito idêntica à do presente estudo, representada principalmente por indivíduos do sexo masculino, heterossexuais e com uma mediana de idades de 39 anos (50). Num outro estudo realizado por Santo *et al.* durante 2000 e 2007 numa clínica de IST em Lisboa a frequência da infeção por *C. trachomatis* foi de 8,4%. Neste último, a maioria dos participantes era também heterossexual (89,4%), contudo maioritariamente jovens (52). Normalmente, e como referido anteriormente as taxas de infeção mais elevadas são observadas em estudos com populações restritas a faixas etárias mais jovens, nomeadamente estudantes (136,137).

No que diz respeito à sintomatologia dos indivíduos estudados, 10,0% referiram sintomas, o que foi concordante com a particularidade desta infeção e a elevada ausência de sintomas, enfatizada em diversos estudos (50,54,121,130,138).

Quando se relacionou a infeção ao género, a frequência de infeção foi idêntica entre estes (3,5% no masculino e 3,1% no feminino). Uma meta-análise de vários estudos sobre a prevalência de *C. trachomatis* concluiu que a prevalência da infeção por este microrganismo é altamente variável entre diversos países do globo, mas com frequências de infeção idênticas entre os géneros (121). O que não está de acordo com as recomendações do CDC (56).

No presente estudo foi verificado que existe uma relação estatisticamente significativa entre a idade e a infeção. A mediana de idades dos indivíduos em cujas

amostras se detetou DNA de *C. trachomatis* foi de 25,5 anos. A relação entre faixas etárias mais jovens e a infeção foi também observada por Pedrosa *et al.* (50).

A maioria dos casos de infeção por *C. trachomatis* notificados encontram-se na faixa etária dos 15-24 anos, pertencentes sobretudo ao sexo feminino, embora se considere que estes dados possam ser influenciados por mais oportunidades de rastreio neste género (2). No presente trabalho apenas 16,8% da população feminina que efetuou pesquisa para *C. trachomatis* tinha entre 15-24 anos.

Ao agrupar os indivíduos pelas idades no que diz respeito ao rastreio segundo o CDC (56) foi demonstrado uma associação estatisticamente significativa entre a infeção nos indivíduos com idade inferior a 25 anos, sendo que neste caso a idade pode aumentar o risco de infeção em cerca de 5,39 vezes. Os resultados são concordantes com o estudo realizado por Dinis *et al.* entre 1991 e 2014, onde se efetuaram colheitas em várias clínicas de cuidados de saúde primários, planeamento familiar e clínicas privadas de ginecologia e urologia, maioritariamente da região de Lisboa, verificando-se que a maior taxa de infeção por *C. trachomatis* ocorre na população jovem com menos de 25 anos (139). Também o estudo de Borges da Costa *et al.* verificou uma associação estatisticamente significativa entre a infeção e a idade inferior a 25 anos (51).

Particularizando para o género, no presente estudo existiu uma maior predominância de indivíduos do sexo feminino infetados por *C. trachomatis* na faixa etária considerada mais predisposta à infeção. A frequência de infeção no sexo feminino com idade inferior a 25 anos foi de 11,6% (IC 95%: 0,055;0,234), superior às frequentemente relatadas em estudos europeus que variam entre 3,6%-7,9% (120,140–142).

O estudo de Afrasiabi *et al.*, realizado no ano de 2013 em mulheres jovens numa clínica de obstetrícia e ginecologia no Irão encontrou diferenças entre as idades, sendo que as infetadas por *C. trachomatis* foram significativamente mais jovens (119). Outros estudos também relacionam a infeção ao sexo feminino (2,52,129,143). Esta relação pode ser resultante das mudanças anatómicas que ocorrem neste género e normalmente nesta faixa etária (144,145).

No presente estudo a associação entre a infeção e a faixa etária abaixo dos 25 anos foi também observada no sexo masculino, embora esta relação tenha sido menor do que para o sexo feminino.

A análise das características sociodemográficas e comportamentais da população em estudo demonstrou que apesar de a infeção ser independente da nacionalidade a maioria dos infetados por *C. trachomatis* não eram de nacionalidade Portuguesa, sendo que destes a maioria eram oriundos dos Países Africanos de Língua Oficial Portuguesa (PALOP). No estudo realizado por Borges da Costa *et al.* existiu uma associação estatisticamente significativa entre a infeção e o facto de não ser caucasiano (51).

No presente estudo observou-se que o estado civil pode influenciar a probabilidade de aquisição da infeção, uma vez que a maioria da população infetada não vivia com o parceiro. O estudo retrospectivo de 10 anos realizado por Guedes *et al.* (2012) em utentes de uma consulta de IST na cidade do Porto, os autores observaram que a maioria dos indivíduos infetados por *C. trachomatis* não viviam com o parceiro (54). Este factor pode ser interpretado como um factor de risco mediado em grande parte pelo impacto que o número de parceiros pode representar.

A maioria dos infetados encontrava-se desempregado, embora pela análise estatística a infeção fosse independente da situação profissional.

Especificamente em relação ao grupo “trabalhadores do sexo”, apenas uma amostra clínica foi positiva para DNA de *C. trachomatis*, correspondendo a um indivíduo do sexo masculino, pelo que a frequência de infeção neste grupo foi de 3,7% (IC 95%: 0,007;0,183). Geralmente esta população apresenta uma prevalência de IST maior do que a encontrada no presente estudo (146). No estudo realizado por Santo *et al.* foi verificado que todos os trabalhadores do sexo estudados apresentavam infeção por *C. trachomatis*, sendo que eram todos pertencentes ao sexo feminino resultando numa percentagem de infeção de 11,7% nesse grupo (52). Porém, no estudo realizado por Corbeto *et al.* que apresentava uma proporção de trabalhadores do sexo igual à deste estudo, nenhum destes apresentou infeção por *C. trachomatis* (130). A baixa incidência pode dever-se a prováveis práticas sexuais mais seguras desta comunidade.

Neste estudo a maioria dos indivíduos com infeção por *C. trachomatis*, apresentavam como habilitação académica o primeiro ciclo, sendo que dados semelhantes foram verificados por Taquette *et al.* (2004) em adolescentes portadores de

IST, no qual a infeção foi mais frequente em estudantes com um atraso de dois anos na vida académica (147). O estudo baseado numa pesquisa populacional para caracterizar a infeção por *C. trachomatis* em França realizado por Goulet *et al.* no ano de 2006 revelou que o baixo nível académico pode estar associado com o risco de contrair infeção por *C. trachomatis* em indivíduos do sexo feminino (140).

Relativamente à orientação sexual da população estudada, não foi possível estabelecer uma comparação entre a infeção e esta variável uma vez que a maioria dos participantes era heterossexual. O mesmo foi verificado nos indivíduos infetados. Observações idênticas foram encontradas em estudos na população portuguesa (50,52,54).

No presente estudo, a análise das características da vida sexual demonstrou que o facto de ter mais do que um parceiro sexual nos últimos seis meses não é independente da infeção por *C. trachomatis*, o que foi também observado por Santo *et al.* e Pedrosa *et al.* (50,52). O estudo realizado por Corbeto *et al.* verificou uma relação estatisticamente significativa entre a infeção por *C. trachomatis* e o facto de apresentarem um parceiro novo nos últimos 3 meses (130).

No presente estudo, quando se particularizou esta característica em relação ao género, no sexo feminino esta relação não foi significativa, uma vez que a maioria dos indivíduos deste género apresentou parceiro fixo. O inverso foi observado no sexo masculino, o que reforça que a mudança de parceiros é um factor de risco na aquisição desta IST bacteriana.

A partir dos resultados obtidos relativamente ao tipo de relação sexual praticada pela população em estudo, concluiu-se que esta pode influenciar a aquisição da infeção ou seja, há um maior risco de contrair a infeção para aqueles que executam vários tipos de práticas sexuais.

O uso inconstante do preservativo é apontado como um fator de risco na aquisição de infeção por *C. trachomatis* em diversos estudos (56,140). No presente estudo verificou-se que a infeção por *C. trachomatis* pode ser dependente do uso do preservativo, observando-se que a maioria dos indivíduos infetados apresenta um uso inconstante do mesmo. No estudo realizado em Lisboa por Brito de Sá *et al.* (2002) em clínicas de planeamento familiar, bem como o estudo realizado em França por Fernandez-Benítez *et al.* (2013) cujo objetivo foi caracterizar a infeção por *C.*

trachomatis, o uso inconstante do preservativo esteve associado à aquisição da infecção (53,142).

Outros fatores de risco como a evidência de ter outras IST concomitantes, ter tido uma IST no passado ou até mesmo uma re-infecção não foi verificado ao contrário do que referido em outros estudos (50,54). Tal facto pode ser consequência do número diminuto de co-infecções, verificando-se apenas dois indivíduos co-infetados com outras IST, nomeadamente o vírus da hepatite B e VIH.

4.2.1 Genótipos

A genotipagem de *C. trachomatis* identificou 6 genótipos diferentes deste microrganismo (D, E, F, G, Ia e L2).

O genótipo mais prevalente foi o genótipo E, seguindo-se o G, posteriormente o D e F e por fim o genótipo Ia e L2. O estudo realizado por Santo *et al.* obteve resultados semelhantes, sendo os genótipos mais frequentemente encontrados, o E, G e F, respetivamente (52).

Alguns autores observaram que o genótipo E é o mais frequentemente isolado (32,142).

Quando se discrimina a frequência em relação ao género, o genótipo mais prevalente tanto no sexo feminino como no masculino foi o E, seguido no sexo feminino do G e do D e do F. No sexo masculino os que se seguiram foram o D, G e F (em dois indivíduos cada) e Ia e L2 em um indivíduo, respetivamente. Nos únicos dois indivíduos que apresentavam sintomas foi isolado o genótipo G.

O indivíduo em que se isolou o genótipo L2 não apresentava sintomas, nem nenhuma IST concomitante, era do sexo masculino, heterossexual e trabalhador do sexo que referiu ter vários tipos de relações sexuais (vaginal e anal), declarando uso inconstante do preservativo. Num estudo realizado em Portugal por Gomes *et al.* (2007) foram encontrados 8 casos de LGV em que 2/8 (25,0%) foram referentes ao serótipo L2 em indivíduos do sexo masculino, heterossexuais, assintomáticos e sem IST no passado (148).

4.3 Infecção por *N. gonorrhoeae*

A frequência da infecção foi de 1,0% tendo sido identificadas seis amostras com DNA positivo de *N. gonorrhoeae*, situação ligeiramente superior à referida no estudo realizado por Guedes *et al.* no qual a incidência desta infecção foi de 0,8% (54). A população era também maioritariamente do sexo masculino e heterossexual (54). Clarivet *et al.* (2014) verificaram uma prevalência de infecção por *N. gonorrhoeae* de 0,4% (120).

A infecção ocorreu sobretudo no sexo masculino apresentando uma frequência de infecção para este género de 1,5% e de 0,4% para o sexo feminino. Contudo, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre a infecção e o género, como também observado por Guedes *et al.* (54).

A maior proporção de infecção no sexo masculino também foi observada por Borges da Costa *et al.* (51).

A sintomatologia foi independente da infecção por *N. gonorrhoeae*, com 16,7% da população infetada sintomática, representada por um indivíduo do sexo masculino. Contudo de acordo com a literatura a maioria das infeções causadas por *N. gonorrhoeae* são normalmente sintomáticas, sendo que os indivíduos do sexo masculino apresentam mais frequentemente sintomatologia que os do sexo feminino (51,54,66,149).

De acordo com os dados relatados na Europa e a nos Estados Unidos da América (EUA), a maioria dos infetados por esta bactéria são indivíduos do sexo masculino na faixa etária dos 20-24 anos (2,150). Neste estudo, todos os indivíduos infetados pertencentes ao sexo masculino, apresentaram idade igual ou superior a 25 anos. Dados idênticos apresentados por Bayette *et al.* (2014) no estudo realizado em França em utentes que se deslocaram à Urgência do Hospital Universitário de Montpellier, em que a prevalência da infecção por *N. gonorrhoeae* foi superior no sexo masculino com idades entre os 25 e os 30 anos (131). A mesma situação se verificou num estudo realizado numa clínica de medicina genito-urinária em Inglaterra por Mohammed *et al.* em indivíduos infetados por *N. gonorrhoeae* (149). Barreiros *et al.* (2013) verificaram que a média de idades dos indivíduos estudados com infecção por *N. gonorrhoeae* foi de 30 anos e estes eram maioritariamente do sexo masculino (151).

O único diagnóstico de presença de DNA de *N. gonorrhoeae* no sexo feminino correspondeu a uma mulher com 19 anos de idade, o que esteve de acordo com o estudo

de Corbeto *et al.* em que apenas um único indivíduo e do sexo feminino apresentou infeção por *N. gonorrhoeae* cuja idade se situou entre os 16-24 anos (130).

Não foram encontradas correlações estatisticamente significativas entre os factores sociodemográficos estudados e a população infetada.

Em relação ao nível de escolaridade dos indivíduos infetados os resultados foram idênticos ao estudo de Barreiros *et al.* verificando-se que a maioria dos indivíduos com infeção por *N. gonorrhoeae* concluíram o ensino secundário/superior (151). Este facto poderá revelar que a população mais instruída também tem comportamentos de risco em relação às IST.

Por sua vez, Remco *et al.* e Borges da Costa *et al.*, verificaram que a infeção por *N. gonorrhoeae* é um bom marcador para o comportamento sexual de risco, devido ao seu período de incubação curto, e por ser frequentemente sintomática, especialmente no sexo masculino, muito embora no presente estudo tenha sido maioritariamente assintomática (83,3%) (51,152).

Segundo o Centro Europeu de Prevenção e Controlo das Doenças (ECDC do inglês *European Centre for Disease Prevention and Control*) um terço dos casos de gonorreia na Europa ocorre em HSH, o que não se verificou no presente trabalho (2). Tal facto poderá estar relacionado com o tipo de população estudada, na sua maioria heterossexual. Contudo, os resultados observados neste estudo foram concordantes com Guedes *et al.* e Clarivet *et al.*, realizados em populações maioritariamente heterossexuais (54,120).

A mudança de parceiro sexual nos últimos seis meses parece ser dependente da infeção por *N. gonorrhoeae*, como também verificado em outras publicações portuguesas (51,151).

Independentemente do uso do preservativo ser estatisticamente independente da infeção por *N. gonorrhoeae* deve notar-se que a maioria dos infetados apresentou uma utilização inconstante do mesmo, sendo esta característica considerada um factor de risco na aquisição desta infeção (56).

O presente estudo mostrou a presença de uma relação significativa com a infeção e o facto de ter tido uma IST no passado por *N. gonorrhoeae*, resultado este também observado pelos estudos de Borges da Costa *et al.* e Barreiros *et al.* (51,151).

4.4 Co-infecções

Em relação à co-infecção por ambos os agentes microbianos estudados, *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae*, observou-se que esta ocorreu em três indivíduos dos 20 infectados por *C. trachomatis* e dos seis por *N. gonorrhoeae*, parecendo existir uma relação entre ambas. Um estudo realizado na Austrália numa população com elevada prevalência de aquisição de IST por Guy *et al.* (2014) os autores observaram que esta co-infecção é duas vezes mais frequente no sexo masculino do que no feminino e em idades mais jovens (153). Estes dados estão de acordo com os do presente estudo, no que diz respeito à idade jovem em que ocorrem estas co-infecções, situada entre os 19-26 anos, sendo que em relação ao género e embora a co-infecção tivesse acontecido em dois indivíduos do sexo masculino e num do sexo feminino, os números são diminutos para tirar conclusões.

Segundo vários estudos as IST, nomeadamente a infeção por *N. gonorrhoeae*, são um cofator de risco acrescido para a aquisição da infeção pelo VIH, sendo esta considerada um marcador útil para comportamentos sexuais de risco (51,151,154). O CDC recomenda o rastreio de outras IST em indivíduos diagnosticadas com VIH e vice-versa (56). Neste estudo não foram encontradas evidências de associações entre a infeção pelo VIH e a infeção por *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae*, embora tal possa ser devido ao número pequeno de amostras.

4.5 Limitações do estudo

Este estudo apresenta algumas limitações, como por exemplo um tamanho relativamente pequeno da amostra para alguns dos parâmetros estudados e também no que diz respeito a determinadas características analisadas. Por exemplo, à idade e à orientação sexual, em que os resultados poderão ter sido influenciados pelo facto de a maioria dos indivíduos apresentar idade superior a 45 anos (39,4%) e serem heterossexuais, uma vez que existe uma aparente probabilidade de os jovens assim como os HSH adquirirem mais facilmente IST (48,56,81).

A participação voluntária neste estudo é outro factor que poderá ter influenciado os seus resultados, uma vez que muitos indivíduos não têm conhecimento dos seus comportamentos de risco e portanto não se predisponham para que lhes seja efetuado rastreio. A maioria das IST é assintomática, existindo muitas vezes por parte dos

indivíduos infetados incapacidade de reconhecer sinais e sintomas, mesmo quando estes estão presentes (127).

4.6 Conclusão e Perspectivas

As atividades necessárias para o controlo das IST apresentam um grande desafio como intervenção de saúde pública (2,107). Na orientação e definição de novas políticas para interromper a transmissão e as complicações das IST é necessário saber quais as lacunas que existem na população onde se pretende atuar. Por estas razões, existe a necessidade de estudos locais, uma vez que, muitas vezes estas lacunas diferem de acordo com o tipo de população.

Várias conclusões se podem inferir e retirar da multiplicidade dos dados obtidos. Uma minoria, dos indivíduos que procuraram efetuar rastreio fizeram-no por terem contacto com factores de risco para as IST. No entanto, na globalidade, foi detetado nesta população evidencia de comportamentos de risco elevado, como relações sexuais não protegidas e uma elevada multiplicidade de parceiros sexuais num curto período de tempo, o que favorece a aquisição de IST.

Verificou-se que uma percentagem elevada (24,4%) destes indivíduos tinham tido uma IST no passado. Em relação à sífilis, 5,5% afirmaram não estar a par desta infeção quando, na realidade, tinham sido anteriormente infetados. Os resultados obtidos também indicam que uma infeção passada por *N. gonorrhoeae* esteve significativamente relacionada à infeção atual pelo mesmo microrganismo. Tudo isto demonstra que a oportunidade de aconselhamento aquando da infeção passada ou se perdeu ou a mensagem não foi transmitida.

Neste estudo ficou mais uma vez demonstrada a importância da co-infeção entre *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae*, assim como dos comportamentos de risco, nomeadamente a utilização inconstante do preservativo e o número elevado de parceiros sexuais, associados à aquisição da infeção por estes microrganismos.

Salienta-se a percentagem elevada de indivíduos infetados que não apresentou sintomatologia, pelo que normalmente não procurará cuidados de saúde específicos, constituindo reservatórios de transmissão das infeções. Devido ao grande número de indivíduos assintomáticos, como observado no presente estudo, a abordagem sindromática não pode ser utilizada como ferramenta nestas populações (141).

A maioria dos indivíduos infetados por *C. trachomatis* apresentava um grau de ensino básico, contrariamente aos indivíduos infetados por *N. gonorrhoeae*, uma vez que estes eram maioritariamente indivíduos com um nível académico mais elevado.

Uma elevada frequência de infeção por *C. trachomatis* foi observada em indivíduos pertencente ao sexo feminino que tinham menos de 25 anos de idade, enquanto que para a infeção por *N. gonorrhoeae* os de mais idade e do sexo masculino apresentaram uma maior frequência de infeção.

Estas observações são só por si indicadoras da urgência da necessidade de programas de educação para a saúde sexual, assim como reforço na promoção do uso do preservativo, uma vez que se demonstrou que atitudes e práticas da vida sexual estão intimamente ligadas com um maior risco de aquisição destas IST. Existe uma falta de consciencialização no alerta dos factores de risco que promovem a aquisição de IST, para além de que a ausência de sintomas existentes na maioria dos indivíduos infectados os impede de procurar os serviços de saúde ou mesmo ajustar as suas práticas de risco (155).

No presente estudo é de notar uma elevada taxa de participantes com nacionalidade pertencente aos PALOP. Esta especificidade verificada essencialmente nas regiões de Lisboa, Loures e Odivelas dever ser reconhecida nas campanhas de saúde.

Este estudo demonstrou que a instituição de um rastreio voluntário usando amostras não invasivas e analisadas por testes de biologia molecular com elevada especificidade e sensibilidade tem consequências positivas na aceitação do rastreio pela população. De referir uma maior adesão por parte da população com uma maior idade eventualmente não receptiva a estas iniciativas de rastreio de IST, assim como da população assintomática que provavelmente não se dirigiria em outras circunstâncias a uma clínica específica de IST.

Os testes de amplificação de ácidos nucleicos (NAAT, do inglês *Nucleic Acid Amplification Techniques*) oferecem uma gama de oportunidades e vantagens sobre os métodos tradicionais para o diagnóstico de agentes patogénicos sexualmente transmissíveis. A maior desvantagem destes testes é o facto de não permitirem a realização de testes de suscetibilidade antimicrobiana (TSA) cruciais no controlo da infeção por *N. gonorrhoeae*.

Os resultados obtidos no presente estudo reforçam a necessidade de implementação de um rastreio em populações que se prevê terem comportamentos sexuais de risco independentemente da idade e do género, tendo em conta a facilidade de colheita das amostras e na execução do teste. Desta forma, considera-se essencial proceder à implementação de programas de rastreio de IST que visem uma abordagem completa, a nível laboratorial, clínico, terapêutico e promoção de saúde sexual

De acordo com os resultados aqui descritos espera-se que esta dissertação permita uma melhor compreensão do comportamento das populações que poderá ser semelhante em outras, contribuindo para o desenvolvimento de estratégias de prevenção e controlo adequadas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **World Health Organization.** Global strategy for the prevention and control of sexually transmitted infections: 2006-2015: breaking the chain of transmission. 2007
[<http://www.who.int/reproductivehealth/publications/rtis/9789241563475/en/>,
acedido em Maio de 2015].
2. **European Centre for Disease Prevention and Control.** Annual epidemiological report: sexually transmitted infections, including HIV and blood-borne viruses 2014. Stockholm: ECDC. 2015
[<http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/sexually-transmitted-infections-HIV-AIDS-blood-borne-annual-epi-report-2014.pdf>,
acedido em Maio de 2015].
3. **Centers for Disease Control and Prevention.** Sexually transmitted disease surveillance 2013. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services. 2014 [<http://www.cdc.gov/std/stats>,
acedido em Maio de 2015].
4. **World Health Organization.** Sexually transmitted infections Fact Sheet. 2014
[<http://www.who.int/reproductivehealth>,
acedido em Maio de 2015].
5. **Fleming DT, Wasserheit JN.** From epidemiological synergy to public health policy and practice: the contribution of other sexually transmitted diseases to sexual transmission of HIV infection. *Sex Transm Infect.* 1999;**75**:3–17.
6. **Ramanathan R, Woodrow K.** Engineering immunity in the mucosal niche against sexually transmitted infections. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 2015. [Epub ahead of print].
7. **Holmes KK, Sparling FP, Stamm WE, Piot P, Wasserheit JN, Corey L, Cohen MS, Watts DH.** Sexually Transmitted Diseases. 4th ed. McGraw-Hill, editor. New York. 2008.
8. **World Health Organization.** Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections - 2008. 2014
[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75181/1/9789241503839_eng.pdf,
acedido em Maio de 2015].
9. **World Health Organization.** Scaling up sexually transmitted infection prevention and control in the European Region. 2010
[http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0003/136848/e94894.pdf?ua=1,
acedido em Maio de 2015].
10. **Schachter J, Stephens RS.** Biology of *Chlamydia trachomatis*. In: McGraw-Hill (ed.). Sexually Transmitted Diseases. 4th ed. 2008. p.555–74.
11. **Nans A, Ford C, Hayward RD.** Host-pathogen reorganisation during host cell entry by *Chlamydia trachomatis*. *Microbes and Infection.* 2015. [Epub ahead of print].
12. **Mackern-Oberti JP, Motrich RD, Breser ML, Sánchez LR, Cuffini C, Rivero VE.** *Chlamydia trachomatis* infection of the male genital tract: An update. *J Reprod Immunol.* 2013;**100**:37–53.

13. **Hafner LM, Wilson DP, Timms P.** Development status and future prospects for a vaccine against *Chlamydia trachomatis* infection. *Vaccine*. 2014;**32**:1563–71.
14. **Nunes A, Gomes JP.** Evolution, phylogeny, and molecular epidemiology of *Chlamydia*. *Infect Genet Evol*. 2014;**23**:49–64.
15. **Borges V, Pinheiro M, Antelo M, Sampaio DA, Vieira L, Ferreira R, Nunes A, Almeida F, Mota LJ, Borrego MJ, Gomes JP.** *Chlamydia trachomatis* in vivo to in vitro transition reveals mechanisms of phase variation and down-regulation of virulence factors. *PLoS One*. 2015;**10**:e0133420.
16. **Abdelsamed H, Peters J, Byrne GI.** Genetic variation in *Chlamydia trachomatis* and their hosts: impact on disease severity and tissue tropism. *Future Microbiol*. 2013;**8**:1129–46.
17. **Stephens RS, Myers G, Eppinger M, Bavoil PH.** Divergence without difference, phylogenetics and taxonomy of Chlamidia resolved. *FEMS Immunol. Med. Microbiol*. 2009; **55**:115-119.
18. **Clarke IN.** Evolution of *Chlamydia trachomatis*. *Ann N Y Acad Sci*. 2011;**1230**:E11–8.
19. **Cevenini R, Donati M, Sambri V.** *Chlamydia trachomatis* - The agent. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2002;**16**:761–73.
20. **Malhotra M, Sood S, Mukherjee A, Muralidhar S, Bala M.** Genital *Chlamydia trachomatis*: an update. *Indian J Med Res*. 2013;**138**:303–16.
21. **Brunham RC, Rey-Ladino J.** Immunology of *Chlamydia* infection: implications for a *Chlamydia trachomatis* vaccine. *Nat Rev Immunol*. 2005;**5**:149–61.
22. **Jalal H, Stephen H, Curran MD, Burton J, Bradley M, Carne C.** Development and validation of a rotor-gene real-time per assay for detection, identification, and quantification of *Chlamydia trachomatis* in a single reaction. *J Clin Microbiol*. 2006;**44**:206–13.
23. **Unemo M, Clarke I.** The Swedish new variant of *Chlamydia trachomatis*. *Curr Opin Infect Dis*. 2011;**24**:62–9.
24. **Ripa T, Nilsson P.** A variant of *Chlamydia trachomatis* with deletion in cryptic plasmid: implications for use of PCR diagnostic tests. *Euro Surveill*. 2006;**11**:E061109.
25. **Yang CL, Maclean I, Brunham RC.** DNA sequence polymorphism of the *Chlamydia trachomatis omp1* gene. *J Infect Dis*. 1993;**168**:1225–30.
26. **Mylonas I.** Female genital *Chlamydia trachomatis* infection: Where are we heading? *Arch Gynecol Obstet*. 2012;**285**:1271–85.
27. **Menon S, Timms P, Allan J a., Alexander K, Rombauts L, Horner P.** Human and pathogen factors associated with *Chlamydia trachomatis*-related infertility in women. *Clin Microbiol Rev*. 2015;**28**:969–85.
28. **Bébéar C, Barbeyrac B.** Genital *Chlamydia trachomatis* infections. *Clin Microbiol Infect*. 2009;**15**:4–10.

29. **Christerson L, Bom RJM, Bruisten SM, Yass R, Hardick J, Bratt G, Gaydos CA, Morré SA, Herrmann B.** *Chlamydia trachomatis* strains show specific clustering for men who have sex with men compared to heterosexual populations in Sweden, the Netherlands, and the United States. *J Clin Microbiol.* 2012;**50**:3548–55.
30. **Morré SA, Rozendaal L, van Valkengoed IGM, Boeke AJP, van Voorst Vader PC.** Urogenital *Chlamydia trachomatis* serovars in men and women with a symptomatic or asymptomatic infection: an association with clinical manifestations?. *J Clin Microbiol.* 2000;**38**:2292–6.
31. **Klint M, Löfdahl M, Ek C, Airell Å, Berglund T, Herrmann B.** Lymphogranuloma venereum prevalence in Sweden among men who have sex with men and characterization of *Chlamydia trachomatis ompA* genotypes. *J Clin Microbiol.* 2006;**44**:4066–71.
32. **Nunes A, Borrego MJ, Gomes JP.** Genomic features beyond *Chlamydia trachomatis* phenotypes: What do we think we know? *Infect Genet Evol.* 2013;**16**:392–400.
33. **Young X, Likuan X.** Progress in genotyping of *Chlamydia trachomatis*. *Chin Med J.* 2014;**127**:3980–6.
34. **World Health Organization.** Laboratory diagnosis of sexually transmitted infections, including human immunodeficiency virus. Dep Reprod Heal Res World Heal Organ. 2013 [http://www.who.int/reproductivehealth/publications/rtis/9789241505840/en/, acedido em Maio de 2015].
35. **Castro R, Baptista T, Vale A, Nunes H, Prieto E, Araújo C, Mansinho K, da Luz Martins Pereira F.** Lymphogranuloma venereum serovar L2b in Portugal. *Int J STD AIDS.* 2010;**21**:265–6.
36. **de Vries HJ, Zingoni A, Kreuter A, Moi H, White JA.** 2013 European guideline on the management of lymphogranuloma venereum. *J Eur Acad Dermatology Venereol.* 2014;**29**:1-6.
37. **Foschi C, Filippini A, Antuono AD, Compri M, Macca F, Banzola N, Marangoni A.** Lymphogranuloma venereum in an Italian MSM: concurrent pharyngeal and rectal infection. *New Microbiol.* 2014;**37**:399–402.
38. **Bax CJ, Quint KD, Peters RP, Ouburg S, Oostvogel PM, Mutsaers JA, Dörr PJ, Schmidt S, Jansen C, van Leeuwen AP, Quint WG, Trimbos JB, Meijer CJ, Morré SA.** Analyses of multiple-site and concurrent *Chlamydia trachomatis* serovar infections, and serovar tissue tropism for urogenital versus rectal specimens in male and female patients. *Sex Transm Infect.* 2011;**87**:503–7.
39. **Versteeg B, van Rooijen MS, van der Loeff MF, de Vries HJ, Bruisten SM.** No indication for tissue tropism in urogenital and anorectal *Chlamydia trachomatis* infections using high-resolution multilocus sequence typing. *BMC Infect Dis.* 2014;**14**:464.
40. **LeFevre M.** Screening for *Chlamydia* and *Gonorrhea*: U.S. Preventive Services Task force recommendation statement. *Ann Intern Med.* 2014;**161**:902–10.

41. **Singh D, Marrazzo JM.** Screening and management of genital chlamydial infections. *Infect Dis Clin North Am.* 2013;**27**:739–53.
42. **Sales JM, Smearman EL, Swartzendruber A, Brown JL, Brody G, DiClemente RJ.** Socioeconomic-related risk and sexually transmitted infection among african-american adolescent females. *J Adolesc Heal.* 2014;**55**(5):698–704.
43. **Centers for Disease Control and Prevention.** Chlamydia control in Europe : literature review. Stockholm: ECDC. 2014 [http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/chlamydia-control-europe.pdf, acedido em Maio de 2015].
44. **Silva J, Cerqueira F, Medeiros R.** *Chlamydia trachomatis* infection: Implications for HPV status and cervical cancer. *Arch Gynecol Obstet.* 2014;**289**(4):715–23.
45. **Seraceni S, De Seta F, Colli C, Del Savio R, Pesel G, Zanin V, D'Agaro P, Contini C, Comar M.** High prevalence of HPV multiple genotypes in women with persistent *Chlamydia trachomatis* infection. *Infect Agent Cancer.* 2014;**9**:30.
46. **European Centers for Disease Control and Prevention.** Sexually transmitted infections in Europe 2013. Stockholm: ECDC. 2015 [http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/sexual-transmitted-infections-europe-surveillance-report-2013.pdf, acedido em Setembro de 2015].
47. **European Centers for Disease Control and Prevention.** Technical Report: Review of Chlamydia Control Activities in Eu Countries. Stockholm: ECDC. 2008 [http://ecdc.europa.eu/en/publications/publications/0805_ter_review_of_chlamydia_control_activities.pdf, acedido em Maio de 2015].
48. **Redmond SM, Alexander-Kisslig K, Woodhall SC, van den Broek IV, van Bergen J, Ward H, Uusküla A, Herrmann B, Andersen B, Götz HM, Sfetcu O, Low N.** Genital *Chlamydia* prevalence in europe and non-european high income countries: systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2015;**10**:e0115753.
49. **Ministério da Saúde.** Doenças de Notificação Obrigatória. Sinave. Despacho 5681-A-2014 de 29/Abril. [http://www.dgs.pt/paginas-de-sistema/saude-de-a-a-z/sinave.aspx, acedido em Maio de 2015].
50. **Pedrosa AF, Azevedo F, Lisboa C.** Screening for *Chlamydia* infection in a sexually transmitted infection clinic: a missed opportunity?. *Int J Dermatol.* 2015;**54**:405–9.
51. **Borges da Costa J, Azevedo J, Santo I.** Sexually transmitted infections and related sociodemographic factors in Lisbon's major Venereology Clinic: A descriptive study of the first 4 months of 2007. *J Eur Acad Dermatology Venereol.* 2010;**24**:811–4.
52. **Santo I, Azevedo J, Nunes B, Gomes JP, Borrego MJ.** Partner notification for *Chlamydia trachomatis* urogenital infections: eight years of patient referral

- experience in the major Portuguese sexually transmitted infections clinic, 2000-07. *Int J STD AIDS*. 2011;**22**:548–51.
53. **Brito de Sá A, Paulo J, Viegas S, Arminda M, Paulino A, Catry A.** Genital infection by *Chlamydia trachomatis* in Lisbon: prevalence and risk markers. *Fam Pract*. 2002;**19**:362–4.
 54. **Guedes R, Simões JS, Azevedo F, Lisboa C.** Infecção por *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae* em utentes de uma consulta de doenças de transmissão sexual - análise de dez anos. *Soc Port Venerol*. 2012;**70**:65–86.
 55. **Rönn MM, Ward H.** The association between lymphogranuloma venereum and HIV among men who have sex with men: systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis*. 2011;**11**:70.
 56. **Workowski KA, Bolan GA.** Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2015. *MMWR Recomm Rep*. 2015;**64**:1–137.
 57. **Trembizki E, Costa A-MG, Tabrizi SN, Whiley DM, Twin J.** Opportunities and pitfalls of molecular testing for detecting sexually transmitted pathogens. *Pathology*. 2015;**47**(3):219–26.
 58. **Bachmann LH, Johnson RE, Cheng H, Markowitz L, Papp JR, Palella FJ, Hook EW.** Nucleic acid amplification tests for diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* rectal infections. *J Clin Microbiol*. 2010;**48**:1827–32.
 59. **Centers for Disease Control and Prevention.** Recommendations for the laboratory-based detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*-2014. *MMWR Recomm Rep*. 2014; **63**:1-19. [<http://www.cdc.gov/std/laboratory/default.htm>, acedido em Maio de 2015].
 60. **Morré SA, Spaargaren J, de Vries JC.** Molecular diagnosis of lymphogranuloma venereum: PCR-based restriction fragment length polymorphism and real-time PCR. *J Clin Microbiol*. 2005;**43**:5412–3.
 61. **Sparling FP.** Biology of *Neisseria gonorrhoeae*. In: McGraw-Hill (ed.). *Sexually Transmitted Diseases*. 4th ed. 2008. p. 433–49.
 62. **Rotman E, Seifert HS.** The Genetics of *Neisseria* Species. *Annu Rev Genet*. 2014;**48**:405–31.
 63. **Virji M.** Pathogenic *neisseriae*: surface modulation, pathogenesis and infection control. *Nat Rev Microbiol*. 2009;**7**:274–86.
 64. **Patel AL, Chaudhry U, Sachdev D, Sachdeva PN, Bala M, Saluja D.** An insight into the drug resistance profile & mechanism of drug resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *Indian J Med Res*. 2011;**134**:419–31.
 65. **Hathorn E, Dhasmana D, Duley L, Ross JD.** The effectiveness of gentamicin in the treatment of *Neisseria gonorrhoeae*: a systematic review. *Syst Rev*. 2014;**3**:104.
 66. **Bignell C, Unemo M.** 2012 European guideline on the diagnosis and treatment of *gonorrhoea* in adults. *Int J STD AIDS*. 2013;**24**:85–92.

67. **Skerlev M, Čulav-Košćak I.** *Gonorrhea*: New challenges. Clin Dermatol. 2014;**32**:275–81.
68. **Bazan JA, Carr Reese P, Esber A, Lahey S, Ervin M, Davis JA, Fields K, Turner AN.** High Prevalence of Rectal *Gonorrhea* and *Chlamydia* Infection in Women Attending a Sexually Transmitted Disease Clinic. J Womens Heal. 2015;**24**:182-89.
69. **Liu Y, Liu W, Russell MW.** Suppression of host adaptive immune responses by *Neisseria gonorrhoeae*: role of interleukin 10 and type 1 regulatory T cells. Mucosal Immunol. 2014;**7**:165–76.
70. **Johnson MB, Criss AK.** Resistance of *Neisseria gonorrhoeae* to neutrophils. Front Microbiol. 2011;**2**:1–12.
71. **Goire N, Lahra MM, Chen M, Donovan B, Fairley CK, Guy R, Kaldor J, Regan D, Ward J, Nissen MD, Sloots TP, Mhiley DM.** Molecular approaches to enhance surveillance of gonococcal antimicrobial resistance. Nat Rev Microbiol. 2014;**12**:223–9.
72. **Barbee LA, Dombrowski JC.** Control of *Neisseria gonorrhoeae* in the era of evolving antimicrobial resistance. Infect Dis Clin North Am. 2013;**27**:723–37.
73. **Cobo F, Cabezas-Fernández MT, Cabeza-Barrera MI.** Antimicrobial susceptibility and typing of *Neisseria gonorrhoeae* strains from Southern Spain, 2012–2014. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2015. [Epub ahead of print].
74. **Ohnishi M, Golparian D, Shimuta K, Saika T, Hoshina S, Iwasaku K, Nakayama S, Kitawaki J, Unemo M.** Is *Neisseria gonorrhoeae* initiating a future era of untreatable gonorrhea?: Detailed characterization of the first strain with high-level resistance to ceftriaxone. Antimicrob Agents Chemother. 2011;**55**:3538–45.
75. **Goire N, Freeman K, Tapsall JW, Lambert SB, Nissen MD, Sloots TP, Whiley DM.** Enhancing gonococcal antimicrobial resistance surveillance: A real-time PCR assay for detection of penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* by use of noncultured clinical samples. J Clin Microbiol. 2011;**49**:513–8.
76. **Blomquist PB, Miari VF, Biddulph JP, Charalambous BM.** Is gonorrhea becoming untreatable? Future Microbiol. 2014;**9**:189–201.
77. **Rodrigues JC, Reis L, Cordeiro D, João I, Diniz M, Nunes A, Forindo C, Borges V, Ferreira R, Pinto M, Varela M, Gomes JP, Borrego MJ.** _ Vigilância laboratorial das infeções por *Neisseria gonorrhoeae* em Portugal, 2004-2013. Inst Nac Saúde Doutor Ricardo Jorge. 2014. [<http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/2382>, acedido em Maio de 2015].
78. **Obergfell KP, Seifert HS.** Mobile DNA in the pathogenic *Neisseria*. Microbiol Spectr. 2015;**3**:1–29.
79. **Siracusano S, Silvestri T, Casotto D.** Sexually transmitted diseases: epidemiological and clinical aspects in adults. Riv Urol. 2014;**81**:200–8.
80. **Van de Laar M, Spiteri G.** Increasing trends of gonorrhoea and syphilis and the threat of drug-resistant gonorrhoea in Europe. Euro Surveill. 2012;**17**:2011–3.

81. **Velicko I, Unemo M.** Recent trends in gonorrhoea and syphilis epidemiology in Sweden: 2007 to 2011. *Euro Surveill.* 2012;**17**:1–6.
82. **Warner L, Stone KM, Macaluso M, Buehler JW, Austin HD.** Condom use and risk of gonorrhea and Chlamydia: a systematic review of design and measurement factors assessed in epidemiologic studies. *Sex Transm Dis.* 2006;**33**:36–51.
83. **European Centre for Disease Prevention and Control.** Response plan to control and manage the threat of multidrug-resistant gonorrhoea in Europe. Stockholm: ECDC. 2012. [<http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/1206-ECDC-MDR-gonorrhoea-response-plan.pdf>, acessado em Maio de 2015].
84. **European Centre for Disease Prevention and Control.** Annual epidemiological report 2013. Reporting on 2011 surveillance data and 2012 epidemic intelligence data. Stockholm: ECDC. 2013. [<http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/Annual-Epidemiological-Report-2013.pdf>, acessado em Maio de 2015].
85. **Buono SA, Watson TD, Borenstein LA, Klausner JD, Pandori MW, Godwin HA.** Stemming the tide of drug-resistant *Neisseria gonorrhoeae*: the need for an individualized approach to treatment. *J Antimicrob Chemother.* 2014;**70**:374–81.
86. **Pathela P, Braunstein SL, Blank S, Schillinger JA.** HIV incidence among men with and those without sexually transmitted rectal infections: Estimates from matching against an HIV case registry. *Clin Infect Dis.* 2013;**57**:1203–9.
87. **European Centre for Disease Prevention and Control.** Gonococcal antimicrobial susceptibility surveillance in Europe 2012. Stockholm: ECDC 2014. [http://ecdc.europa.eu/en/publications/_layouts/forms/Publication_DispForm.aspx?List=4f55ad51-4aed-4d32-b960-af70113dbb90&ID=1138, acessado em Maio de 2015].
88. **European Centre for Disease Prevention and Control.** Annual epidemiological report: Antimicrobial resistance and healthcare-associated infections 2014. Stockholm: ECDC. 2015. [http://ecdc.europa.eu/en/publications/_layouts/forms/Publication_DispForm.aspx?List=4f55ad51-4aed-4d32-b960-af70113dbb90&ID=1292, acessado em Maio de 2015].
89. **Chisholm SA, Quaye N, Cole MJ, Fredlund H, Hoffmann S, Jensen JS, van de Laar MJ, Unemo M, Ison CA.** An evaluation of gentamicin susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Europe. *J Antimicrob Chemother.* 2011;**66**:592–5.
90. **Florindo C, Pereira R, Boura M, Nunes B, Paulino A, Gomes JP, Borrego MJ.** Genotypes and antimicrobial-resistant phenotypes of *Neisseria gonorrhoeae* in Portugal (2004-2009). *Sex Transm Infect.* 2010;**86**:449–53.
91. **Tavares E, Fernandes C, Borrego MJ, Rodrigues A, Cardoso J.** Resistência aos antibióticos em *Neisseria gonorrhoeae* – passado, presente e futuro. *Soc Port Dermatologia e Venerol.* 2012;**70**:483–93.

92. **Mayor MT, Roett MA, Uduhiri KA.** Diagnosis and management of gonococcal infections. *Am Fam Physician*. 2012;**86**:931–8.
93. **Cook R, Hutchison S, Ostergaard L, Braithwaite R, Ness R.** Systematic review: noninvasive testing for *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *Ann Intern Med*. 2005;**142**:914–25.
94. **Forni J, Miles K, Hamill M.** Microscopy detection of rectal gonorrhoea in asymptomatic men. *Int J STD AIDS*. 2009;**20**:797–8.
95. **Elias J, Frosch M, Vogel U.** *Neisseria*. In: American Society of Microbiology (ed.). *Manual of clinical microbiology*. 10th ed. Washington, DC; 2011. p. 559–603.
96. **Alexander S, Ison C.** Evaluation of commercial kits for the identification of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Med Microbiol*. 2005;**54**:827–31.
97. **Alexander S.** The challenges of detecting gonorrhoea and chlamydia in rectal and pharyngeal sites: could we, should we, be doing more? *Sex Transm Infect*. 2009;**85**:159–60.
98. **Golparian D, Tabrizi S, Unemo M.** Analytical specificity and sensitivity of the APTIMA Combo 2 and APTIMA GC assays for detection of commensal *Neisseria* species and *Neisseria gonorrhoeae* on the Gen-Probe Panther instrument. *Sex Transm Dis*. 2013;**40**:175–8.
99. **Masek BJ, Arora N, Quinn N, Aumakhan B, Holden J, Hardick A, Agreda P, Barnes M, Gaydos CA.** Performance of three nucleic acid amplification tests for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* by use of self-collected vaginal swabs obtained via an internet-based screening program. *J Clin Microbiol*. 2009;**47**(6):1663–7.
100. **Fifer H, Ison CA.** Nucleic acid amplification tests for the diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae* in low-prevalence settings: a review of the evidence. *Sex Transm Infect*. 2014;**90**:577–9.
101. **Whiley D, Garland S, Harnett G, Lum G, Smith D, Tabrizi S, Sloots TP, Tapsall JW.** Exploring “best practice” for nucleic acid detection of *Neisseria gonorrhoeae*. *Sex Health*. 2008;**5**:23–5.
102. **Palmer HM, Mallinson H, Wood RL, Herring AJ.** Evaluation of the specificities of five DNA amplification methods for the detection of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol*. 2003;**41**:835–7.
103. **Whiley DM, Buda PJ, Bayliss J, Cover L, Bates J, Sloots TP.** A new confirmatory *Neisseria gonorrhoeae* real-time PCR assay targeting the *porA* pseudogene. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2004;**23**:705–10.
104. **Ho BS, Feng WG, Wong BK, Egglestone SI.** Polymerase chain reaction for the detection of *Neisseria gonorrhoeae* in clinical samples. *J Clin Pathol*. 1992;**45**:439–42.
105. **Lyss S, Kamb M, Peterman T, Moran JS, Newman DR, Bolan G, Douglas JM, Iatesta M, Malotte CK, Zenilman JM, Ehret J, Gaydos C, Newhall WJ.** *Chlamydia trachomatis* among patients infected with and treated for *Neisseria*

- gonorrhoeae* in sexually transmitted disease clinics in the United States. *Ann Intern Med*. 2003;**139**:178–85.
106. **World Health Organization**. Global action plan to control the spread and impact of antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. 2012. [<http://www.who.int/reproductivehealth/publications/rtis/9789241503501/en/>, acedido em Maio de 2015].
 107. **European Centre for Disease Prevention and Control**. Chlamydia control in Europe. Stockholm: ECDC. 2009. [http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/0906_GUI_Chlamydia_Control_in_Europe.pdf, Maio de 2015].
 108. **Manavi K**. A review on infection with *Chlamydia trachomatis*. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2006;**20**:941–51.
 109. **Marcus U, Ort J, Grenz M, Eckstein K, Wirtz K, Wille A**. Risk factors for HIV and STI diagnosis in a community-based HIV/STI testing and counselling site for men having sex with men (MSM) in a large German city in 2011–2012. *BMC Infect Dis*. 2015;**15**:1–8.
 110. **World Health Organization**. Sexually Transmitted Infections (STIs). 2013. [http://www.who.int/reproductivehealth/publications/rtis/rhr13_02/en/, acedido em Maio de 2015].
 111. **Roberts TE, Robinson S, Barton PM, Bryan S, McCarthy A, Macleod J, Egger M, Low N**. Cost effectiveness of home based population screening for *Chlamydia trachomatis* in the UK: economic evaluation of chlamydia screening studies (ClaSS) project. *BMJ*. 2007;**335**:291.
 112. **Falk L, Coble B-I, Mjörnberg P, Fredlund H**. Sampling for *Chlamydia trachomatis* infection - a comparison of vaginal, first-catch urine, combined vaginal and first-catch urine and endocervical sampling. *Int J STD AIDS*. 2010;**21**:283–7.
 113. **U.S. Preventive Services Task Force**. Screening for Chlamydial Infection: U.S. Preventive Services Task Force Recommendation Statement. *Ann Intern Med*. 2007;**147**:128–35.
 114. **Cunha CB, Friedman RK, de Boni RB, Gaydos C, Guimarães MRC, Siqueira BH, Cardoso Sw, Chicayban L, Coutinho JR, Yanavich C, Veloso VG, Grinsztejn B**. *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* and syphilis among men who have sex with men in Brazil. *BMC Public Health*. 2015;**15**:686.
 115. **Annan NT, Sullivan a K, Nori A, Naydenova P, Alexander S, McKenna A, Azadian B, Mandalia S, Rossi M, Ward H, Nwokolo N**. Rectal chlamydia-a reservoir of undiagnosed infection in men who have sex with men. *Sex Transm Infect*. 2009;**85**:176–9.
 116. **Patton ME, Kidd S, Llata E, Stenger M, Braxton J, Asbel L, Bernstein K, Gratzner B, Jespersen M, Kerani R, Mettenbrink C, Mohamed M, Pathela P, Schumacher C, Stirland A, Stover J, Tabidze I, Kirkcaldy RD, Weinstock H**. Extragenital Gonorrhea and Chlamydia Testing and Infection Among Men Who

- Have Sex With Men-STD Surveillance Network, United States, 2010-2012. Clin Infect Dis. 2014;**58**:1564–70.
117. **Singh S, Bradley H, Hu X, Skarbinski J, Hall HI, Lansky A.** Men Living with Diagnosed HIV Who Have Sex with Men: Progress Along the Continuum of HIV Care — United States, 2010. MMWR Recomm Rep. 2014;**63**:829–45.
 118. **Adams EJ, Charlett a, Edmunds WJ, Hughes G.** *Chlamydia trachomatis* in the United Kingdom: a systematic review and analysis of prevalence studies. Sex Transm Infect. 2004;**80**:354–62.
 119. **Afrasiabi S, Moniri R, Samimi M, Khorshidi A, Mousavi SG.** The Prevalence of Endocervical *Chlamydia trachomatis* Infection Among Young Females in Kashan, Iran. Jundishapur J Microbiol. 2015;**8**: e15576.
 120. **Clarivet B, Picot E, Marchandin H, Tribout V, Rachedi N, Schwartzentruber E, Ledésert B, Dereure O, Guillot B, Picot MC.** Prevalence of *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* and *Mycoplasma genitalium* in asymptomatic patients under 30 years of age screened in a French sexually transmitted infections clinic. Eur J Dermatology. 2014;**24**:611–6.
 121. **Dielissen PW, Teunissen D a M, Lagro-Janssen ALM.** Chlamydia prevalence in the general population: is there a sex difference? a systematic review. BMC Infect Dis. 2013;**13**:534.
 122. **Sergeant SGE.** Epitools epidemiological calculators. AusVet Animal Health Services and Australian Biosecurity Cooperative Research Centre for Emerging Infectious Disease. 2015. [<http://epitools.ausvet.com.au>., acedido em Julho de 2015]
 123. **Brown DL, Tony Cai T, DasGupta A.** Interval Estimation for a Binomial Proportion. Stat Sci. 2001;**16**:101–33.
 124. **Lorimer K, MacDaid L.** Young Men’s Views Toward the Barriers and Facilitators of Internet-Based *Chlamydia trachomatis* Screening: Qualitative Study. J Med Internet Res. 2013;**15**:e265.
 125. **Choudhury B, Risley CL, Ghani AC, Bishop CJ, Ward H, Fenton KA, Ison CA, Spratt BG.** Identification of individuals with gonorrhoea within sexual networks: a population-based study. Lancet. 2006;**368**:139–46.
 126. **Bonita R, Beaglehole R, Kjellstrom T.** Epidemiologia Básica. 2ª Edição. 2010.
 127. **Mendes N, Palma F, Serrano F.** Sexual and reproductive health of Portuguese adolescents. Int J Adolesc Med Heal. 2014;**26**:3–12.
 128. **Repiso-Jiménez JB, Fernandez-Morano T, Rivas-Ruiz F, de Troya-Martin M.** Análisis de la población con infección genital por *Chlamydia trachomatis* en una consulta de enfermedades de transmisión sexual. Actas Dermosifiliogr. 2014;**105**:774–9.
 129. **Corsenac P, Noël M, Rouchon B, Hoy D, Roth A.** Prevalence and sociodemographic risk factors of chlamydia, gonorrhoea and syphilis: a national multicentre STI survey in New Caledonia, 2012. BMJ Open. 2015;**5**:e007691.

130. **Corbeto EL, Lugo R, Martró E, Falguera G, Ros R, Avecilla A, Coll C, Saludes V, Casabona J.** Prevalencia de la infección por *C. trachomatis* y *N. gonorrhoeae* y determinantes para su adquisición en jóvenes y adultos-jóvenes en Cataluña. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;**29**:96–101.
131. **Bayette J, Jreige R, Marchandin H, Laurens C, Joullié F, Clarivet B, Sebbane M, Jean-Pierre H.** Prévalence des infections à *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* et *Mycoplasma genitalium* chez des patients admis aux urgences. *Pathol Biol*. 2013;**61**:245–9.
132. **Hammarstrom S, Tikkanen R, Stenqvist K.** Identification and risk assessment of Swedish youth at risk of *chlamydia*. *Scand J Public Health*. 2015;**43**:399–407.
133. **Gomes A, Nunes C.** Caracterização do uso do preservativo em jovens adultos portugueses. *Análise Psicológica*. 2011;**4**:489–503.
134. **Nuñez-Forero L, Moyano-Ariza L, Gaitán-Duarte H, Ángel-Müller E, Ruiz-Parra A, González P, Rodríguez A, Tolosa JL.** Diagnostic accuracy of rapid tests for sexually transmitted infections in symptomatic women. *Sex Transm Infect*. 2015;**0**:1–5.
135. **Muñoz-Silva A, Sánchez-García M, Martins A, Cristina N.** Gender differences in HIV-related sexual behavior among college students from Spain and Portugal. *Span J Psychol*. 2009;**12**:485–95.
136. **Gravningen K, Furberg A-S, Simonsen GS, Wilsgaard T.** Early sexual behaviour and *Chlamydia trachomatis* infection - a population based cross-sectional study on gender differences among adolescents in Norway. *BMC Infect Dis*. 2012;**12**:319.
137. **Imai H, Nakao H, Shinohara H, Fujii Y, Tsukino H, Hamasuna R, Osada Y, Fukushima K, Inamori M, Ikenoue T, Katon T.** Population-based study of asymptomatic infection with *Chlamydia trachomatis* among female and male students. *Int J STD AIDS*. 2010;**21**:362–6.
138. **Wangnapi RA, Soso S, Unger HW, Sawera C, Ome M, Umbers AJ, Ndrewai N, Siba P, Li Wai Suen CS, Vallely A, Wapling J, Ryan C, Mueller I, Rogerson SJ.** Prevalence and risk factors for *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* and *Trichomonas vaginalis* infection in pregnant women in Papua New Guinea. *Sex Transm Infect*. 2014;**0**:1–7.
139. **Dinis M, Cordeiro D, Santo I, Azevedo J, Gomes JP, Borrego MJ.** Diagnóstico laboratorial da infeção por *Chlamydia trachomatis*, 1991-2014. *Inst Nac Saúde Doutor Ricardo Jorge*. 2015;**16**–8. [http://www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/ComInf/Noticias/Paginas/DIAG_LAB_INF_CHLAM.aspx, acedido em Agosto de 2015]
140. **Goulet V, de Barbeyrac B, Raherison S, Prudhomme M, Semaille C, Warszawski J.** Prevalence of *Chlamydia trachomatis*: results from the first national population-based survey in France. *Sex Transm Infect*. 2010;**86**:263–70.
141. **Peuchant O, Le Roy C, Desveaux C, Paris A, Asselineau J, Maldonado C, Chêne G, Horovitz J, Dallay D, de Barbeyrac B, Bébéar C.** Screening for *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, and *Mycoplasma genitalium*

- should it be integrated into routine pregnancy care in French young pregnant women? *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2015;**82**:14–9.
142. **Fernández-Benítez C, Mejuto-López P, Otero-Guerra L, Margolles-Martins MJ, Suárez-Leiva P, Vazquez F.** Prevalence of genital *Chlamydia trachomatis* infection among young men and women in Spain. *BMC Infect Dis*. 2013;**13**:388.
 143. **Pedersen KS, Andersen JS.** Social-, age- and gender differences in testing and positive rates for *Chlamydia trachomatis* urogenital infection - a register-based study. *Fam Pract*. 2014;**31**:699–705.
 144. **Adderley-Kelly B, Stephens EM.** Chlamydia: A major health threat to adolescents and young adults. *ABFN J*. 2005;**16**:52–5.
 145. **Berman S, Hein K.** Adolescents and STDs, Including HIV Infection. In: McGraw-Hill (ed.). *Sexually Transmitted Diseases*. 4th ed. New York; 2008. p. 165–85.
 146. **Platt L, Jolley E, Rhodes T, Hope V, Latypov A, Reynolds L, Wilson D.** Factors mediating HIV risk among female sex workers in Europe: a systematic review and ecological analysis. *BMJ Open*. 2013;**3**:e002836.
 147. **Taquette SR, Mello De Vilhena M, Campos De Paula M.** Doenças sexualmente transmissíveis na adolescência: Estudo de fatores de risco. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2004;**37**:210–4.
 148. **Gomes JP, Nunes A, Florindo C, Ferreira MA, Santo I, Azevedo J, Borrego MJ.** Lymphogranuloma Venereum in Portugal. *Sex Transm Dis*. 2009;**36**:88–91.
 149. **Mohammed H, Ison CA, Obi C, Chisholm S, Cole M, Quaye N, Hughes G.** Frequency and correlates of culture-positive infection with *Neisseria gonorrhoeae* in England: a review of sentinel surveillance data. *Sex Transm Infect*. 2014;**91**:287–93.
 150. **Centers for Disease Control and Prevention.** Reported STDs in the United States 2013 National Data for Chlamydia, Gonorrhea, and Syphilis. 2014. [<http://www.cdc.gov/nchhstp/newsroom/docs/factsheets/std-trends-508.pdf>, acessado em Maio de 2015].
 151. **Barreiros H, Azevedo J, Santo I.** Evolução da infecção por *Neisseria gonorrhoeae* numa população da consulta de DST do centro de saúde da Lapa de 2007 a 2011. *Rev da Soc Port Dermatologia e Venereol*. 2013;**71**:65–70.
 152. **Peters RP, Verweij SP, Nijsten N, Ouburg S, Mutsaers J, Jansen CL, van Leeuwen AP, Morré SA.** Evaluation of sexual history-based screening of anatomic sites for *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infection in men having sex with men in routine practice. *BMC Infect Dis*. 2011;**11**:203.
 153. **Guy R, Ward J, Wand H, Rumbold A, Garton L, Hengel B, Silver B, Taylor-Thomson D, Knox J, McGregor S, Dyda A, Fairley C, Maher L, Donovan B, Kaldor J.** Coinfection with *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* and *Trichomonas vaginalis*: a cross-sectional analysis of positivity and risk factors in remote Australian Aboriginal communities. *Sex Transm Infect*. 2014;**0**:1–6.

154. **Fenton K, Imrie J.** Increasing rates of sexually transmitted diseases in homosexual men in Western Europe and the United States: Why? *Infect Dis Clin North Am.* 2005;**19**:311–31.
155. **Berry S.** Gonorrhoea and chlamydia screening in HIV clinics: time for new tools and targets. *Sex Transm Infect.* 2014;**90**:574–5.

6. ANEXOS

Anexo 1: Questionário para recolha dos dados demográficos

Inquérito Doenças Sexualmente Transmissíveis – Laboratório DST/IHMT

Identificação _____ **Data** ____/____/____

Nº de entrada IHMT _____

Idade ____ Sexo ____ Contato telefónico _____ Contacto de: _____

Nacionalidade:	Escolaridade:	Estado civil:	Situação profissional:
Portuguesa <input type="checkbox"/>	E. Básico <input type="checkbox"/>	Solteiro(a) <input type="checkbox"/>	Estudante <input type="checkbox"/>
Outra _____	E. Secundário <input type="checkbox"/>	Casado(a) <input type="checkbox"/>	Empregado <input type="checkbox"/>
	E. Superior <input type="checkbox"/>	União de Facto <input type="checkbox"/>	Desempregado <input type="checkbox"/>
	S/Grau de Ensino <input type="checkbox"/>	Divorciado(a) <input type="checkbox"/>	Reformado <input type="checkbox"/>
	Outra <input type="checkbox"/>	Separado(a) <input type="checkbox"/>	Sem ocupação <input type="checkbox"/>
		Viúvo(a) <input type="checkbox"/>	Outra _____

Motivo rastreio _____

ANTECEDENTES PESSOAIS

Idade 1ª rel. sexual _____ Nº de parceiros total _____

Nº de parceiros últimos 6 meses _____

Outras _____

Sexo parceiros: ♀ ☐ ♂ ☐ ambos ☐

Tipo de contacto sexual: vaginal ☐ oral ☐ anal ☐

Uso preservativo:

Vaginal: Nunca ☐ Sempre ☐ Às vezes ☐

Oral: Nunca ☐ Sempre ☐ Às vezes ☐

Anal: Nunca ☐ Sempre ☐ Às vezes ☐

DST anteriores: Nega ☐; Sim ☐; Quais: _____

Teste VIH anterior _____

Na atual consulta efetuou:

Apenas teste rápido VIH ☐ Resultado: Negativo ☐ Positivo ☐

Rastreio IST ☐ Tipo de amostras sangue ☐; urina ☐; exsudado vaginal ☐

Resultado teste rápido VIH: Negativo ☐ Positivo ☐

HISTÓRIA ACTUAL de IST

Data contacto suspeito _____

Sintomático ☐ Assintomático ☐

Início de sintomas ____/____/____

Úlceras genitais ☐

Corrimento uretral ☐

Disúria ☐

Prurido uretral ☐

Sintomas rectais ☐

Tenesmo ☐

Corrimento. ☐

Sangue/muco fezes ☐

Dor rectal ☐

Outros _____

Corrimento vaginal ☐

Tipo _____

Prurido vaginal ☐

Lavagem vaginal ☐

Hem. Intermenstrual ☐

Com: _____

Hem. pós-coito ☐

Febre ☐

Dor pélvica/abdominal ☐

Prurido cutâneo ☐

Já efectuou terapêutica:
sim ☐ não ☐

Qual: _____

Vesículas genitais ☐

Vesículas peri-orais ☐

Cura ☐

Adenopatias inguinais ☐

Manutenção ☐

Artralgias ☐

Agravamento ☐

Exantema ☐